

(19)



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets

(11)



EP 0 714 987 A2

(12)

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:  
05.06.1996 Patentblatt 1996/23

(51) Int Cl. 6: C12Q 1/68, C07H 21/04,  
C12P 19/34, C12N 15/85,  
C07K 14/00

(21) Anmeldenummer: 95890171.2

(22) Anmeldetag: 26.09.1995

(84) Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IE IT LI NL SE

- Kohl, Johann, Dr.  
A-1160 Wien (AT)
- Himmelstach, Michèle, Dr.  
A-1100 Wien (AT)
- Dorner, Friedrich, Prof. Dr.  
A-1230 Wien (AT)

(30) Priorität: 26.09.1994 AT 1830/94

(74) Vertreter: Weinzinger, Arnulf, Dipl.-Ing. et al  
Patentanwälte  
Sonn, Pawlak, Weinzinger & Wolfram  
Riemergasse 14  
A-1010 Wien (AT)

(72) Erfinder:

- Hämerle, Thomas, Dr.  
A-2304 Orth/Donau (AT)
- Falkner, Falko-Günter, Dr.  
A-2304 Orth/Donau (AT)

### (54) Verfahren zur Quantifizierung von genetischer DNA

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Quantifizierung von genetischer DNA in einer Probe, welches die Schritte

- ) Amplifizieren der in der Probe enthaltenen DNA durch ein Nukleinsäure-Amplifizierungsverfahren unter Verwendung von Primern, welche zu repetitiven genetischen Sequenzen komplementär sind, und
- ) Detektieren der erhaltenen, amplifizierten DNA umfaßt; zur Erzielung eines exakten quantitativen Information wird dabei vorgesehen, daß
- ) vor dem Amplifizieren in an sich bekannter Weise eine gegebene Menge mindestens einer bekannten Nukleinsäure der Probe als interner Standard zugegeben wird, wobei sich die Standard-Nukleinsäure zum mindesten in einem zu detektierenden Merkmal von der zu quantifizierenden genetischen DNA unterscheidet, und
- ) die Menge an amplifizierter genetischer DNA und die Menge an amplifizierter Standard-Nukleinsäure bestimmt werden und ausgehend von der erhaltenen Menge an Standard-Nukleinsäure die Menge der ursprünglich in der Probe vorhandenen genetischen DNA bestimmt wird.

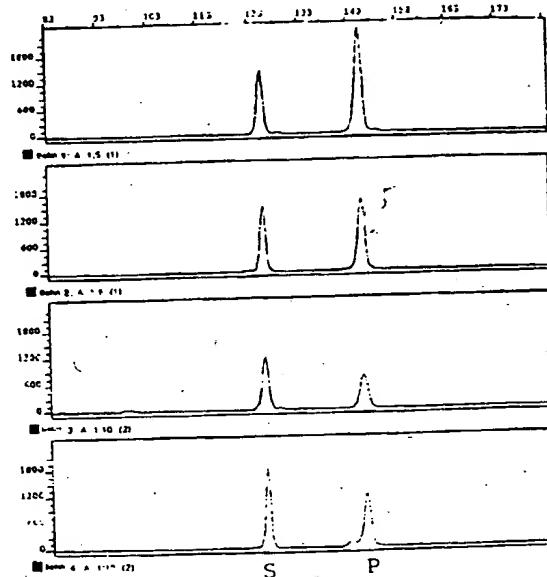


Fig. 2-A

EP 0 714 987 A2

## Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Quantifizierung von genomischer DNA in einer Probe, welches die Schritte

5 -) Amplifizieren der in der Probe enthaltenen DNA durch ein Nukleinsäure-Amplifizierungsverfahren unter Verwendung von Primern, welche zu repetitiven genomischen Sequenzen komplementär sind, und  
-) Detektieren der erhaltenen, amplifizierten DNA umfaßt.

10 Der Einsatz von biotechnologisch gewonnenen Proteinen in der Medizin stellt die pharmazeutische Industrie vor neue Probleme in der Qualitätsüberprüfung ihrer Produkte. Für die Bestimmung von Verunreinigungen, die von der Zellkultur herrühren, müssen neue Nachweismethoden etabliert werden. So verlangt zum Beispiel die Welt-Gesundheits-Organisation, daß die Menge heterologer kontaminierender DNA in rekombinanten Produkten unter 100 pg pro verabreichter Dosis sein muß, wohingegen die Bestimmungen der U.S. Food and Drug Administration lediglich 10 pg DNA pro Einzeldosis akzeptieren.

15 Die Bestimmung von kontaminierender DNA in rekombinanten Produkten wird bisher zum größten Teil durch Hybridisierung auf Membranen gemacht. Per (Clin. Chem. 35 (1989), 1859) zeigt auf, daß bis zu 5 pg DNA nachgewiesen werden können, wenn radioaktiv markierte genomische Sonden verwendet werden. Allerdings zeigt sich in einem Ringversuch, an dem sich vierzehn Labors beteiligt haben, daß die DNA-Bestimmung mittels Hybridisierung weder innerhalb eines Labors noch bei Vergleich verschiedener Labors befriedigende reproduzierbare Ergebnisse liefert (Robertson und Heath, Biologicals 20 (1992), 73).

20 Gilliland beschreibt eine quantitative PCR-Methode, die auf einer kompetitiven PCR-Reaktion beruht (PNAS 87 (1990), 2725). Zur Bestimmung von DNA Mengen verwendet er eine Verdünnungsreihe des internen Standard, der gleichzeitig mit der Probe amplifiziert wird. Die PCR-Reaktion wird bis zur Sättigung durchgeführt. Dies erlaubt auch die Detektion der PCR-Produkte mittels Ethidiumbromidfärbung. Die PCR-Produkte werden anschließend auf einem Gel aufgetrennt, die Kopienzahl der Probe wird mit der Kopienzahl der Standard-Verdünnungsreihe verglichen und so die Konzentration der Probe abgeschätzt. Diese Konzentrationsabschätzung ist dann exakt, wenn die Konzentration des Standards und der Probe etwa im Verhältnis 1:1 in einem Reaktionsgefäß amplifiziert wurden. Dies wiederum impliziert, daß die Bestimmung der DNA-Menge umso genauer erfolgt, je mehr Standardverdünnungen verwendet werden.

25 Eine Methode zur Quantifizierung von RNA wurde von Wang et al. vorgeschlagen (PNAS 86 (1989), 9717). Diese PCR-Reaktion wird in der exponentiellen Phase gestoppt. Die Autoren schaffen sich durch Amplifikation unterschiedlicher Standardkonzentrationen eine Eichkurve (externe Standardisierung). Da in der exponentiellen Reaktionsphase die Kopienanzahl der PCR-Produkte direkt proportional zur Anzahl der vorhandenen RNA-Moleküle steigt, ist diese Eichkurve eine Gerade, in der man schließlich die Konzentration einer amplifizierten Probe ablesen kann. Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Endkonzentration der PCR-Produkte relativ gering ist, sodaß man für die Detektion empfindliche Nachweismethoden anwenden muß. Wang et al. benutzen radioaktiv markierte Nukleotide.

30 Eine Verbesserung in der Detektion von geringen Mengen an PCR-Produkten gelang Porcher et al. (BioTechnique 13 (1992), 106) durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Primern und der Quantifizierung der PCR-Produkte mit einem automatischen Laser-Fluoreszenz-Sequenzer.

35 Alle diese Methoden ermöglichen die Bestimmung geringer Mengen homologer Sequenzen, wie bestimmte Gene, virale DNA-Abschnitte oder mRNA. Eine exakte Methode zur Bestimmung von kontaminierender heterogener genetischer DNA konnte aber bisher nicht gefunden werden.

40 In der WO 94/12669 wird eine PCR-Methode zur Detektion von kontaminierender DNA vorgeschlagen, bei der repetitive Sequenzen des Genoms amplifiziert werden. Mit dieser Methode sollen DNA-Mengen von 0,1 pg bis zu 0,01 pg detektiert werden können. Eine geeignete Quantifizierung der chromosomal DNA ist jedoch mit dieser Methode nicht möglich. Weder ist die Zugabe eines Standards vor der Amplifizierungsreaktion beschrieben, noch ist eine Vorgangsweise geoffenbart, wie aus der Menge an amplifizierter DNA auf die ursprünglich in der Probe enthaltene gesamte chromosomal DNA rückgeschlossen werden kann. Es wird lediglich erwähnt, daß die repetitiven Sequenzen zumindest in einer Konzentration von 1% im Genom des die Probe kontaminierenden Organismus vorhanden sein müssen.

45 Bei der in den Beispielen beschriebenen Bestimmung kontaminierender DNA für Hamsterzellen (CHO) wird jedoch nicht angegeben, wieviele repetitive Sequenzen das CHO-Genom beinhaltet. Auch in der Literatur konnten keine Angaben dafür gefunden werden. Ohne diese Angabe ist aber eine exakte Rückrechnung auf den Gehalt an verunreinigender DNA in einer Probe prinzipiell nicht möglich, da jedenfalls eine quantitative Beziehung zwischen dem amplifizierten DNA-Stück und der gesamten chromosomal DNA zu dieser Rückrechnung notwendig ist.

50 Es sei auch noch erwähnt, daß die Detektion der PCR-Produkte gemäß der WO 94/12669 mit dem Farbstoff Hoechst 32258 erfolgt, der sich in DNA einlager. Dieser Farbstoff wird nach der PCR-Reaktion den Reaktionsprodukten zugegeben. Abgesehen davon, daß diese Analytik das Verwenden eines internen Standards ausschließt, ist diese Charakterisierung aufgrund ihrer geringen Empfindlichkeit ungeeignet für eine exakte Quantifizierung von DNA. Dies

war auch gar nicht Aufgabe der WO 94/12669. In dieser Methode zur Detektion von DNA ging es lediglich darum, eine Ja/Nein-Antwort zur Frage, ob chromosomale DNA in der zu untersuchenden Probe enthalten ist, zur Verfügung zu stellen.

5 Für eine exakte DNA-Konzentrationsbestimmung mittels PCR ist die Zugabe eines internen Standards aber unbedingt notwendig, da sich gezeigt hat, daß die Effizienz der PCR-Reaktion oftmals von Reaktionsgefäß zu Reaktionsgefäß unterschiedlich sein kann. Dieser Effizienzunterschied kann Unterschiede in den Ergebnissen bis zu 10<sup>5</sup> ergeben. Diese Fehlerquelle wird bei der Methode gemäß der WO 94/12669 völlig ignoriert, und die Reproduzierbarkeit der Methode gemäß der WO 94/12669 ist daher zweifelhaft.

10 Die vorliegende Erfindung stellt sich daher die Aufgabe, ein Verfahren zur Quantifizierung von chromosomaler DNA zur Verfügung zu stellen, welches eine sehr genaue quantitative Information bezüglich der Gesamtmenge an chromosomaler DNA in einer Probe ermöglicht.

15 Das erfindungsgemäße Verfahren der eingangs erwähnten Art ist dadurch gekennzeichnet, daß

- ) vor dem Amplifizieren in an sich bekannter Weise eine gegebene Menge einer bekannten Nukleinsäure der Probe als interner Standard zugegeben wird, wobei sich die Standard-Nukleinsäure zumindest in einem zu detektierenden Merkmal von der zu quantifizierenden genomischen DNA unterscheidet, und
- ) die Menge an amplifizierter genomischer DNA und die Menge an amplifizierter Standard-Nukleinsäure bestimmt werden und ausgehend von der erhaltenen Menge an Standard-Nukleinsäure die Menge der ursprünglich in der Probe vorhandenen genomischen DNA bestimmt wird.

20 Durch dieses Verfahren wird es erstmals möglich, den Gehalt an chromosomaler DNA in einer Probe über die Quantifizierung einer bestimmten Teilmenge der chromosomal DNA (im vorliegenden Fall eine bestimmte repetitive Sequenz) zu bestimmen.

25 Unter Nukleinsäure-Amplifizierungen sind prinzipiell Verfahren zu verstehen, welche auf der von Mullis et al. (U. S. PS 4,683,195 und 4,683,202) und anderen entwickelten Technologien beruhen, beispielsweise die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), die reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) oder die Ligase-PCR (LCR).

30 Die Standard-Nukleinsäure muß sich in wenigstens einem zu detektierbaren Merkmal von der zu amplifizierenden genomischen DNA unterscheiden, sie sollte aber mit Hilfe der gleichen Primer amplifiziert werden können. Als praktisch haben sich Standard-Nukleinsäuren erwiesen, die eine andere Größe als die zu amplifizierende genomische DNA oder eine von der zu amplifizierenden genomischen DNA verschiedene Restriktionsschnittstelle aufweisen. Die Standard-Nukleinsäure ist vorzugsweise eine DNA, da eine möglichst große Ähnlichkeit zwischen Standard-Nukleinsäure und der in der Probe zu quantifizierenden chromosomal DNA bestehen sollte. Dies gilt auch für den GC-Gehalt, die Restriktionsstellen, die Sequenz, etc. Bevorzugte Standards unterscheiden sich von der zu amplifizierenden chromosomal DNA in 1 % bis 20 % ihrer Länge. Die genaue Sequenz der Standard-Nukleinsäure sollte natürlich bekannt sein.

35 Die beim Amplifizieren verwendeten Primer enthalten vorzugsweise Gruppen, welche die Nachweisgrenze der amplifizierten Nukleinsäuren erhöhen, beispielsweise fluoreszierende oder radioaktive Gruppen oder chemische Gruppen, die mit affinen Proteinen und nachgeschalteten Detektionsreaktionen detektiert werden können (z.B. Biotin-Avidin, Digoxigenin-Markierung, etc.), wobei Primer mit fluoreszierenden Gruppen besonders bevorzugt sind.

40 Die bevorzugte repetitive genomische Sequenz für die Analyse von DNA stellen Alu-Sequenzen oder Alu-äquivalente Sequenzen dar, wobei die Primer vorzugsweise an einen Teil der Alu-äquivalenten Konsensussequenzen, insbesondere der Alu-äquivalenten Konsensussequenzen von Säugern, insbesondere von Nagetieren und Primaten, binden.

45 Die Bestimmung der DNA-Mengen (unter DNA-Menge versteht man prinzipiell die Quantität an DNA: eine DNA-Menge kann z.B. in Form von Masse (mg, µg, ng, pg, ...) oder als Anzahl der Kopien eines bestimmten DNA-Moleküls angegeben werden) nach der Amplifizierung kann auf unterschiedlichste Art erfolgen, meist jedoch ist ein Schritt vorzusehen, bei welchem die amplifizierte Standard-Nukleinsäure von der amplifizierten, zu quantifizierenden genomischen DNA getrennt wird und die getrennten DNA-Mengen separat bestimmt werden. Vorzugsweise besteht dieser Trennungsschritt in einer Gelelektrophorese oder in einem chromatographischen Verfahren.

50 Als besonders geeignet haben sich Detektionsverfahren erwiesen, welche automatisch erfolgen und den Trennungs- und Quantifizierungsschritt kombinieren. Eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht daher darin, daß die Bestimmung der Mengen an amplifizierter Nukleinsäure unter Verwendung eines Nukleinsäure-Deektionsgerätes, vorzugsweise eines fluoreszenz-empfindlichen Nukleinsäure-Detektionsgerätes, erfolgt. Beispiele für solche Nukleinsäure-Detektionsgeräte sind automatische DNA-Sequenzer mit laserinduzierten Fluoreszenz-Meßeinrichtungen (z.B. Gene Scanner®373A der Firma Applied Biosystems) oder HPLC-Anlagen. Bei diesen Geräten ist es möglich, DNA-Moleküle voneinander zu trennen, die sich lediglich um ein bp in der Länge unterscheiden.

55 Ein besonderer Vorteil des Gene Scanner® ist es, unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe in einer einzigen Spur

unterscheiden zu können. Dies ermöglicht die gleichzeitige Aufarbeitung einer Vielzahl von Proben auf einem Gel, da alle am Gel zur Verfügung stehenden Spuren für Proben verwendet werden können. Weiters ist es möglich, eine Vielzahl von PCR-Produkten, markiert mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen, in einer einzigen Bahn zu analysieren (Multiplex-PCR) und dabei genomische DNA verschiedenen Ursprungs in einer Probe nachzuweisen. Beim gleichzeitigen Nachweis von beispielsweise zwei verschiedenen Nukleinsäuren in einer Probe wird außerdem Aufwand und Kosten nahezu halbiert. Dies ist beim Einsatz des erfindungsgemäßen Verfahrens im Routinebetrieb von besonderem Vorteil. Im Gegensatz dazu kann der von Porcher et al. zur Analyse der PCR Produkte verwendete automatische Laser-Fluoreszenz-DNA-Sequenzer nur einen Fluoreszenzfarbstoff (und damit nur eine DNA) pro Spur analysieren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird der Amplifizierungsschritt bereits in der exponentiellen Phase gestoppt.

Dadurch wird erreicht, daß das Verhältnis der Kopienanzahl des amplifizierten Standards direkt proportional zur Kopienanzahl der repetitiven Sequenz ist. Weiters kann durch Koamplifikation eines einzigen Standards die Kopienanzahl der repetitiven Sequenz festgestellt werden. In diesem Punkt ist die erfindungsgemäße Methode der viel verwendeten Methode von Gilliland et al. weit überlegen, da man pro Probe lediglich einen Standard mitlaufen lassen muß, wogegen die Methode nach Gilliland um so genauer wird, desto mehr Standards in verschiedenen Verdünnungen in verschiedenen Proben verwendet werden.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird vorzugsweise kontaminierende genomische DNA bestimmt. Diese Bestimmung ist besonders wichtig bei der Bestimmung von kontaminierender DNA in Impfstoffen oder bei der Qualitätskontrolle rekombinanter Produkte aus Zellkulturen.

Die Menge der in der Probe zu quantifizierenden genomischen DNA wird vorzugsweise mittels einer Eichgerade von der Menge an amplifizierter Standard-Nukleinsäure bestimmt.

Bisher gab es nämlich in der Literatur noch keine Hinweise, wie der Rückschluß von einer zuvor bestimmten kleineren Menge (Kopienanzahl der repetitiven Sequenzen) auf eine größere übergeordnete Menge (genomische DNA) gemacht werden soll. Es ist lediglich bekannt, daß der Anteil der repetitiven Sequenzen im Genom im Bereich von 1-10% liegt. Ein linearer Zusammenhang zwischen einer amplifizierten repetitiven Sequenz und der Gesamtmenge an genomischer DNA wurde bisher nicht geoffenbart.

Dieser Zusammenhang ist daher bevorzugterweise mit einer Eichkurve herzustellen, welche folgendermaßen ermittelt werden kann:

Verschiedene bekannte Konzentrationen einer genomischen DNA einer Spezies werden mit dem erfindungsgemäßen Verfahren in einer kompetitiven Nukleinsäure-Amplifizierungsverfahren unter Verwendung eines internen Standards amplifiziert. Das Verfahren wird in der exponentiellen Phase gestoppt, und die Mengen der amplifizierten Nukleinsäuren werden bestimmt.

Die Peak-Fläche (=Kopienzahl), die der amplifizierte interne Standard ergibt, ist dann direkt proportional zur Peak-Fläche (=Kopienzahl) der amplifizierten repetitiven Sequenz der eingesetzten genomischen DNA. Für die Eichkurve trägt man die daraus errechnete Kopienzahl der repetitiven Sequenz gegen die ursprünglich eingesetzte Menge an genomischer DNA auf. Dabei wurde überraschenderweise festgestellt, daß bei geringer DNA-Konzentration (0 bis 60 pg/ml) diese Eichkurve eine Gerade darstellt. Aus dieser Geraden kann ein Faktor errechnet werden, der schließlich für die Bestimmung von unbekannten DNA-Mengen herangezogen wird.

Nach der erfindungsgemäßen Methode wird daher die Menge an genomischer DNA in pg/ml nach der folgenden Formel berechnet:

$$m_{\text{Probe}} = A_{\text{Probe}} / A_{\text{Standard}} \times N_{\text{Standard}} \times F_1 \times D \times 1/F_2$$

worin

$A_{\text{Probe}}$  die Peak-Fläche der amplifizierten chromosomal DNA der Probe,  
 $A_{\text{Standard}}$  die Peak-Fläche des amplifizierten internen Standards.

$N_{\text{Standard}}$  die eingesetzten Kopien des internen Standards.

$F_1$  das Verhältnis des Volumens des Standards zum extrahierten Volumen.

$D$  der Verdünnungsfaktor (falls die Probe vor der Extraktion verdünnt worden ist) und  
 $F_2$  der Umrechnungsfaktor ist, der angibt, wieviel detektierbare Kopien der repetitiven Sequenz pro pg genomischer DNA enthalten sind.

Diese Eichkurve ist charakteristisch für die verwendete genomische DNA, die eingesetzten Primer und die speziell gewählten Amplifizierungsbedingungen.

Wichtige Kriterien bei der Quantifizierung von chromosomal DNA sind die Sensitivität und die Reproduzierbarkeit. Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können DNA-Mengen im Bereich von 1 pg bis 100 pg sehr genau und reproduzierbar bestimmt werden. Damit ist aber keineswegs die Sensitivitätsgrenze der Methode erreicht

Das erfindungsgemäße Verfahren eignet sich besonders gut zur Überprüfung und Qualitätskontrolle von biotechnologisch hergestellten Proteinen, wobei es keine Einschränkung auf das Herstellungsverfahren der Proteine gibt. Beispielsweise können rekombinante Proteine, transgene Proteine oder mittels der Hybridom-Technologie gewonnene Proteine durch das erfindungsgemäße Verfahren auf ihren Gehalt an chromosomaler DNA untersucht werden. Die Multiplex-Analyse ermöglicht es, monoklonale Antikörpern, die in Hybridoma-Zelllinien gezüchtet worden sind, auf kontaminierende DNA der Ursprungs-Spezies in einfacher und effizienter Weise zu untersuchen.

Die Qualitätskontrolle insbesondere bei Impfstoffen oder rekombinanten Proteinen kämpft allerdings mit Hintergrund-Problemen. So kann man beim Bestimmen von kontaminierender chromosomaler DNA bei Primaten-Zellkulturen auch die Verunreinigungen durch die Handhabung während der Produktion oder während der Aufarbeitung der Produkte durch das erfindungsgemäße Verfahren erfassen, wenn die eingesetzten Primer spezifisch für alle Primaten-Alu-Sequenzen sind. Erfolgt die Produktion von rekombinanten Proteinen allerdings in Nicht-Primaten-Zellkulturen, wie zum Beispiel CHO (Chinese Hamster Ovarienzellen), BHK (Baby Hamster Nierenzellen) oder CEC (Hühner-Embryozellen), so ist die Nachweisgrenze mit der erfindungsgemäßen Methode weit geringer, da das Problem der Verunreinigungen durch die Handhabung der Probe wegfällt. Besonders bevorzugt wird die erfindungsgemäße Quantifizierungsmethodik bei genomischer DNA aus CHO-, Vero-(Affenzelllinie), BHK-, SK-Hep1-(menschliche Leberzelllinie), Hybridomzellen oder CEC-Zellen angewendet, da diese Zellkulturen am gebräuchlichsten bei der Produktion von Impfstoffen, rekombinanten Proteinen oder monoklonalen Antikörpern sind.

Die Reproduzierbarkeit der erfindungsgemäßen Methode beträgt zumindest 95%. Um dies zu erreichen, muß darauf geachtet werden, daß die Effizienz der Amplifizierungsreaktion für den Standard und die Probe gleich groß ist. Die Effizienz der Amplifizierungsreaktion ist vor allem dann von Bedeutung, wenn sie in der exponentiellen Phase gestoppt wird.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher die Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Überprüfung und Qualitätskontrolle von biologischen Präparaten, besonders von biotechnologisch erzeugten Präparaten, da bei diesen die Gefahr der Kontamination mit DNA besonders groß ist. Vorteilhafterweise wird das erfindungsgemäße Verfahren bei der Überprüfung und Qualitätskontrolle von HIV-Oberflächenantigen gp160, rekombinanten Blutfaktoren, Plasmaproteinen und Impfstoffen (z.B. Vakzine gegen Herpes-, Influenza- oder Tick-Borre-Encephalitis(TBE)-Viren) verwendet.

Durch die hohe Empfindlichkeit und die besonders niedrige Nachweisgrenze des erfindungsgemäßen Verfahrens können neue Qualitätskriterien bei biologischen Produkten festgestellt werden, welche durch einen äußerst geringen bzw. fehlenden Gehalt an kontaminierenden Nukleinsäuren definiert sind.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung daher biologische, insbesondere biotechnologische Produkte, die zumindest einen unterhalb der erlaubten Grenzen von 10 bzw. 100 pg pro Dosis und mit dem vorliegenden Verfahren gemessenen Gehalt an chromosomaler DNA aufweisen und damit als im wesentlichen frei von Fremd-DNA gelten können.

Zu den bevorzugten Produkten gehören virale Proteine, wie gp160, rekombinante Blutfaktoren, Plasmaproteine, sowie Impfstoffe, insbesondere gegen Herpes-, Influenza-, Hepatitis- oder TBE-Viren.

Beeinflußt wird die Effizienz der PCR-Reaktion zum Beispiel von der Bindung der Primer an Standard- und Probe-Nukleinsäuren. Deshalb werden vorzugsweise dieselben Primer für den Standard und die Probe verwendet und diese Primer sollten möglichst 100% homolog zu den Primerbindungsstellen von Standard und zu amplifizierender genomscher DNA sein. Für den synthetischen Standard stellt dies kein Problem dar, wohl aber für die zu amplifizierenden genomischen Sequenzen. Repetitive Sequenzen sind nämlich nicht notwendigerweise zu 100% homolog, sie haben oft unterschiedliche Sequenzen. Bei der Auswahl der Primer muß daher darauf geachtet werden, daß die am strengsten konservierte Nukleotidabfolge herangezogen wird. Je weniger der Primer homolog zur genomischen repetitiven Sequenz ist, desto schlechter erfolgt die Bindung des Primers und umso schlechter ist auch die Effizienz der PCR-Reaktion. Die Primer im erfindungsgemäßen Verfahren werden durch Alignment konservierter DNA-Abschnitte innerhalb der repetitiven Sequenzen in Gendatenbanken ausgesucht.

Daher betrifft die vorliegende Erfindung gemäß einem weiteren Aspekt Primer, welche im vorliegenden Verfahren zur Anwendung kommen, nämlich

50 Alu A2/2: GCCGGCGTAGTGGCGGGCGCCTGTAGT bp 149-176 Seq. ID 1  
 Alu B: GAGACAGAGTCTCGCTCTGTCCCCAGG bp 294-267 Seq. ID 2  
 (Numerierung nach Batzer et al. (Nucl. Acid Res. 18 (1990) 6793)  
 CR1: ATGAGGCACGTGGAACAGGTTGCC bp 260-283 Seq. ID 3  
 55 CR1A CAGGGCCACATCCAGCCTGG bp 345-326 Seq. ID 4  
 (Numerierung nach Stumph et al. (PNAS 81 (1984) 6667-6671).  
 und Plasmide für die Herstellung der Standards, nämlich

5 pAlu-wt (bestehend aus dem bekannten pCRII-Plasmid und einem Insert an der multiplen Klonierungsstelle, welches Insert die Basenpaare (bp) 148 bis 294 der Alu-repeat-spezifischen Sequenz aus Batzer et al. enthält)

10 pAlu20 (abgeleitet aus pAlu-wt mit einer Deletion von 20 bp an bp 178 der Alu-repeat-spezifischen Sequenz aus Batzer et al.)

15 pCR1-wt (bestehend aus dem bekannten pCRII-Plasmid (Firma InVitrogen) und einem Insert an der EcoRI-Stelle des pCRII-Plasmids, welches Insert die bp 260 bis 345 der CR1-Sequenz aus Stumph et al. (1984) enthält)

20 pCR1+11 (abgeleitet aus dem Plasmid pCR1-wt, indem eine 11 Nukleotide lange Insertion an der bp300-Stelle eingefügt wurde)

25 pCR1-8 (abgeleitet aus dem Plasmid pCR1-wt, indem eine 8 Nukleotide lange Deletion an der Position 302 (gemäß Stumph et al.) vorgenommen wurde)

30 Die Effizienz der Amplifizierungsreaktion hängt auch von der Art des zu amplifizierenden DNA Moleküls ab. Es hat sich für das erfindungsgemäße Verfahren von Vorteil erwiesen, den internen Standard in linearisierter Form vor der Amplifizierung zuzusetzen. Dadurch werden weitere Unterschiede in der Effizienz der Reaktion ausgeglichen, die auf die unterschiedliche Form der zu amplifizierenden DNA zurückzuführen sind.

35 Gemäß einem weiteren Aspekt bezieht sich die vorliegende Erfindung auch auf ein Set zur Quantifizierung genetischer Nukleinsäuren in einer Probe, welches umfaßt:

- mindestens eine bekannte Nukleinsäure als internen Standard, welche sich von den zu quantifizierenden Nukleinsäuren in mindestens einem nachweisbaren Charakteristikum unterscheidet,
- Fluoreszenz-markierte Primer, die an die Standardnukleinsäure und an die zu quantifizierende Nukleinsäure binden,
- positive Kontrollen, welche bekannte Mengen an genetischer Nukleinsäure aufweisen,
- eine negative Kontrolle, welche einen von Nukleinsäuren freien Puffer aufweist,
- eine Arbeitsanleitung.

40 Bevorzugte Ausführungsformen des Sets gemäß der vorliegenden Erfindung sind die folgenden:

45 1.) Set zur Quantifizierung genetischer DNA von Primaten in einer Probe, welches umfaßt:

- als internen Standard, das Plasmid pAlu 20
- die Fluoreszenz-markierten Primer Alu A2/2 und AluB
- positive Kontrollen, die bekannte Mengen an Vero-Zell-DNA aufweisen
- eine negative Kontrolle, die einen von genetischer Nukleinsäure freien Puffer aufweist und
- eine Arbeitsanleitung.

50 2.) Set zur Quantifizierung genetischer Vogel-DNA in einer Probe, welches umfaßt:

- als internen Standard, die Plasmide pCR1+15 und pCR1-8
- die Fluoreszenz-markierten Primer CR1 und CR1A
- positive Kontrollen, die bekannte Mengen an Vogel-DNA aufweisen,
- eine negative Kontrolle, die einen von genetischer Nukleinsäure freien Puffer aufweist und
- eine Arbeitsanleitung.

55 Die Erfindung wird in den nachstehenden Beispielen und den dazugehörigen Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht beschränkt sein soll, noch weiter erläutert. Insbesondere wird in den Beispielen gezeigt, daß das erfindungsgemäße Verfahren sich hervorragend für eine routinemäßige, schnelle und trotzdem genaue und reproduzierbare Quantifizierung von chromosomaler DNA in unterschiedlichsten Proben eignet.

60 Es zeigen:

65 Fig.1 die Eichgerade für chromosomal Affen-DNA, wobei die Menge an genetischer DNA in pg/ml gegen die Anzahl der gefundenen Kopien pro ml aufgetragen wurde;

70 Fig.2 die Ergebnisse der Quantifizierung von chromosomaler Affen-DNA; und

75 Fig.3 die Ergebnisse der Quantifizierung von chromosomaler Hühner-DNA.

Fig. 4 ist das Sequenzprotokoll.

### Beispiele

5 1. Allgemeine Arbeitsvorschriften:

1.1. Prinzip des Verfahrens

10 Nukleinsäuren unterschiedlicher Herkunft werden mittels PCR unter Verwendung von Primern, welche fluoreszierende Gruppen haben, amplifiziert (Saiki et al., Science 239 (1985) 487-491). Die Analyse und die Quantifizierung der erhaltenen amplifizierten PCR-Produkte wurde mit Hilfe eines automatischen DNA-Sequenzierers mit laserinduzierter Fluoreszenz-Meßeinrichtung (373A Gene-Scanner® von Applied Biosystems) ausgeführt. Dieses Instrument ist in der Lage, die Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte mittels einer Gelelektrophorese in einem Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen der Größe nach aufzutrennen und deren Menge quantitativ zu bestimmen. Die Kopienanzahl bestimmter Sequenzen in der Probe wird auf Grundlage der erhaltenen Intensitäten der PCR-Produkte von chromosomaler DNA und internem Standard bestimmt. Unter Anwendung eines gegebenen Verhältnisses zwischen 15 Anzahl an amplifizierten repetitiven chromosomalen Sequenzen pro Standard-Masse der DNA (siehe "Erstellung der Eichgeraden") kann direkt auf die gesamte in der Probe vorhandene chromosomal DNA geschlossen werden.

20 1.2. Extraktion der Nukleinsäuren

25 500 µl einer Probe werden 5 µl 1 M TRIS/HCl pH 8,0 und 10 µl Proteinase K (Boehringer Mannheim, 20 mg/ml) sowie 20 µl 20%-ige SDS-Lösung zugesetzt. Eine bestimmte Menge an Standard-Nukleinsäure und 1 µg Herring-Sperma-DNA wird zugesetzt, und die Probe wird 1 h lang bei 56°C inkubiert. Die Probe wird nacheinander mit Phenol und Chloroform extrahiert, und 10 µl Glykogen (Boehringer Mannheim, 20 mg/ml) werden zugesetzt. Anschließend wird mit Ethanol präzipitiert, zentrifugiert, das Pellet gewaschen und schließlich in Wasser wieder gelöst.

1.3. PCR

30 Der PCR-Ansatz enthält in bekannter Weise ein Aliquot der extrahierten Nukleinsäure, PCR-Puffer (Boehringer Mannheim), MgCl<sub>2</sub>, dNTPs, Primer, Taq-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim, 5,0 E/µl) und Wasser. Die PCR wird gemäß den Angaben des Herstellers von Puffer und Enzym bzw. gemäß üblicher Arbeitsvorschriften (Mullis et al., Methods in Enzymology 155 (1987), 335) in einem PCR-Apparatur (GeneAmp PCR System 9600 der Firma Perkin-Elmer) durchgeführt.

35 1.4. Analyse der Produkte

40 Für die Bestimmung und Quantifizierung der PCR-Produkte werden der PCR-Lösung 0,5 bis 1,0 µl entnommen und in einem 373A Instrument der Firma Applied Biosystems und der speziellen "gene scan" Software gemäß den Angaben des Herstellers analysiert.

2.1. Beispiel 1: Quantifizierung von genomischer Affen-DNA

45 Bei dieser Quantifizierung werden Primer verwendet, welche in einer hochkonservierten Region in den sogenannten "Alu repeat" Sequenzen binden und ein 146 bp-Fragment amplifizieren (Jelinek et al., Ann. Rev. Biochem. 51 (1982) 813-844), nämlich

Alu A2/2: GCCGGCGTAGTGGCGGGCGCCTGTAGT bp 149-176 Seq. ID 1

Alu B: GAGACAGAGTCTCGCTCTGTCGCCAGG bp 294-267 Seq. ID 2

50 (Numerierung nach Batzer et al.). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoamidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

Das Standard-Plasmid pAlu20 ist abgeleitet aus dem Plasmid pAlu-wt, welches aus dem bekannten pCRII-Plasmid (Firma InVitrogen) und einem Insert an der multiplen Klonierungsstelle des pCRII-Plasmids besteht, welches Insert die bp 148 bis 294 der Alu-repeat-spezifischen Sequenz aus Batzer et al. enthält.

55 In pAlu20 wurden die bp 178 bis 197 deletiert. Das Plasmid wurde gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit EcoRI g. schnitten und in einem 10mM TRIS/HCl pH 8/0,1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. Molecular Cloning, Second Edition. Cold Spring Harbor Lab

Press, Cold Spring Harbor (1989)).  
Die Länge der PCR-Produkte von Standard und Wildtyp-DNA betragen daher 126 und 146 bp.

2.1: Erstellung der Eichgradiaden mit Affen DNA

Zur Bestimmung der Anzahl Alu-Kopien pro pg genomischer Affen-DNA wurden jeweils 3 Kalibrierungsläufe durchgeführt (blank, 2 pg, 5 pg, 10 pg, 20 pg, 40 pg, 60 pg, 100 pg DNA/ml). Alle ermittelten Daten (6 PCR-Reaktionen pro Konzentrationsstufe) sind in Tabelle 1 zusammengefaßt und die Regressionsgerade ist in Fig.1 dargestellt.

	DNA	KG	RG	MW	SD	VK%
10	0	4533,92996				
	2	21599,4238	21974,0922			
	2	18983,3919	21974,0922	20099,8091	3822,30746	19,0166357
	2	19900,3524	21974,0922			
	2	25246,6524	21974,0922			
15	2	14769,225	21974,0922			
	5	44883,8779	48134,3354			
	5	52631,2571	48134,3354			
	5	51109,4418	48134,3354	45055,9297	8108,004	17,9954205
	5	32068,2966	48134,3354			
20	5	44586,7749	48134,3354			
	10	97555,2485	91734,7409			
	10	101015,717	91734,7409	90598,5793	10754,6015	11,8706073
	10	86335,9144	91734,7409			
	10	77487,4372	91734,7409			
25	20	108834,009	178935,552			
	20	199305,642	178935,552			
	20	203203,788	178935,552	172039,16	41076,2263	23,876091
	20	197098,228	178935,552			
	20	151754,131	178935,552			
30	40	363341,143	353337,174			
	40	402578,42	353337,174			
	40	433036,566	353337,174	383303,318	33743,5526	8,8033552
	40	351420,48	353337,174			
	40	366139,983	353337,174			
	60	594815,223	527738,796			
35	60	505612,823	527738,796	506228,628	69570,4812	13,7428975
	60	424808,212	527738,796			
	60	499678,254	527738,796			

TABELLE 1

40 DNA: DNA in pg/ml

KG: Kopien gefunden

RG: Regression

45 MW: Mittelwert

SD: Standardabweichung

VK%: Variationskoeffizient

50 Die Berechnung der Daten erfolgte über folgende Beziehungen:

$$\text{Fläche}_{\text{Probe}} : \text{Fläche}_{\text{pAlu-20}} = x$$

$$x : (\text{Fläche}_{\text{Blank}} : \text{Fläche}_{\text{pAlu-20}}) = y \text{ (korrigiertes Flächenverhältnis)}$$

55 y multipliziert mit 100 000 = Kopienanzahl in 500 µl Probe = z (500 µl wurden extrahiert, 100 000 Kopien des Standardplasmids wurden zugegeben)

z multipliziert mit 2 = Kopienanzahl pro ml

Nach der Berechnung der Regressionsgeraden ( $y = 4533,9 + 6720,1 x$ ) ergab sich ein durchschnittlicher Wert von 9200 Kopien pro pg genomischer Affen-DNA.

## 2.2. Quantifizierung von chromosomaler Affen-DNA (Vero-Zellen)

5 Vorstufen von Impfstoff-Chargen, die nach Barrett et al. (AIDS Research and Human Retroviruses 5 (1989); 159-171) hergestellt wurden, wurden mittels DNA-Extraktion und quantitativer PCR mit Hilfe der Primer Alu A2/2 und 10 AluB und einem internen Standard (pAlu20), der von denselben Primern erkannt wird, jedoch ein in der Größe verschiedenes PCR-Produkt liefert, untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 2 und Fig.2-A bis 2-I 15 dargestellt.

10 Tabelle 2 gibt Art, Umfang und Meßwerte der gemessenen Proben wieder. In Spalte 1 ist die Kopienzahl des Standardplasmids pAlu20 angegeben; Spalte 2 gibt die Verdünnungsstufe der Probe an, wobei der Wert 1 einer unverdünnten Probe gleichkommt; Spalte 1 gibt das extrahierte Volumen an Probe an; Spalten 4 und 5 bezeichnen die 15 Verdünnungen (Puffer und Verdünnung des Standards); Spalte 6 gibt die Art der Probe (Chargen-Nummer der gp160-Präparation; Puffer und Verdünnung des Standards); Spalte 8 bezeichnet Meßwerte in pg Vero Gesamt-DNA pro ml Probe an und Spalte 7 die Mittelwerte dieser Messungen; Spalte 9 und 10 geben die Fläche 20 der Nummer der Bahn, auf der die Probe analysiert worden ist (siehe auch: Fig.2); Spalten 9 und 10 geben die Fläche des gemessenen Standardpeaks bzw. des zu messenden Peaks an chromosomaler DNA an. Die erste Zeile ist eine Kontrollzeile.

25

30

35

40

45

50

55

TABELLE 2

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50

1000000	0.5	311594 1:4 A 1:5 (1)	241	198.5	285. 01	120581	27170
1000000	0.5	311594 1:4 A 1:5 (1)	186		285. 02	12028	18096
1000000	0.5	311594 1:4 A 1:10 (2)	187		285. 03	11748	10007
1000000	0.5	311594 1:4 A 1:10 (2)	200		285. 04	14171	12841
1000000	0.5	311594 1:5 (3)	420	100.5	285. 05	13484	48634
1000000	0.5	311594 1:5 (3)	704		265. 06		
1000000	0.5	311594 1:10 (4)	202		255. 07	19993	25922
1000000	0.5	311594 B 1:10 (4)	297		205. 08	28019	38011
1000000	0.5	Puffer PBS C 1:5 (5)	0	<2	285. 09	28499	1831
1000000	0.5	Puffer PBS C 1:5 (5)	2		285. 10	30680	2641
1000000	0.5	Puffer PBS C 1:10 (6)	<2		285. 11	18819	1624
1000000	0.5	Puffer PBS C 1:10 (6)	<2		285. 12	19812	2072
1000000	0.5	311594 D 1:5 (7)	821	572	285. 13	13619	72068
1000000	0.5	311594 D 1:5 (7)	820		266. 14	10815	73890
1000000	0.5	311594 D 1:10 (8)	407		285. 15	40842	72606
1000000	0.5	311594 D 1:10 (8)	440		265. 16	30240	57837
1000000	0.5	TK E 1:5 (9)	<1	49.75	285. 17	<1	<1
1000000	0.5	TK E 1:5 (9)	16		285. 18	36870	7232
1000000	0.5	TK E 1:10 (10)	17		285. 19	45380	8403
1000000	0.5	TK E 1:10 (10)	180		285. 20	30372	23400
1000000	0.5	311594 E 1:5 (11)	293	400.25	285. 21	27771	93765
1000000	0.5	311594 E 1:5 (11)	359		285. 22	27083	03534
1000000	0.5	311594 F 1:10 (12)	403		285. 23	38680	69886
1000000	0.5	311594 F 1:10 (12)	473		265. 24	30446	64072
1000000	0.5	1:20 (13)	0		285. 26	61658	<1
1000000	0.5	1:20 (13)	0		285. 28	47800	<1
1000000	0.5	1:20 (14)	0		285. 27	24016	1730
1000000	0.5	1:20 (14)	0		265. 20	43893	2400
1000000	0.5	1:20 (15)	0		285. 29	47000	2223
1000000	0.5	1:20 (15)	0		285. 30	26893	1978
1000000	0.5	2019 RNA (16)	24		285. 31	3715	40101
1000000	0.5	2029 DNA (16)	23		285. 32	43085	44121
1000000	0.5	5.99	4.2		285. 33	11039	44607
1000000	0.5	5.99	3.6		285. 34	12661	39280
1000000	0.5	PCR	0		285. 35	<1	<1
1000000	0.5	PCR	0		265. 36	<1	<1

55 In Fig. 2 ist die graphische Auswertung der quantitativen Bestimmung der PCR-Produkte dargestellt. In den verschiedenen Bahnen sind die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der PCR-Produkte (und Nebenprodukte) dargestellt. Die Produkte sind anhand ihrer definierten Größe (in bp) identifizierbar. Der Standard pAlu20 (S) erscheint bei 126 bp, der Wildtyp-Peak (P) bei 146 bp Peak-flächen und Berechnung der DNA-Menge sind in Tabelle 2 dargestellt.

## 3. Quantifizierung chromosomaler Hühner-DNA

Sinn dieser Optimierung von Primern und PCR-Bedingungen ist die genaue und spezifische Messung im Konzentrationsbereich 1 pg - 100 pg Hühner-DNA pro ml Probe. Um die gewünschte Spezifität und eine Sensitivität der Messung im pg-Bereich zu erreichen, wurde als Zielsequenz für die PCR die Sequenz einer repetitiven DNA-Familie ausgewählt. Diese DNA-Familien sind nicht nur zum Großteil artspezifisch, sondern treten in großer Kopienzahl im Genom auf und erfüllen deshalb die Kriterien für eine Bestimmung von geringen Mengen spezifischer DNA. In der Familie der Aves (Vögel) wurde die CR1-repetitive DNA-Familie beschrieben, die in 7000 bis 20000 Kopien pro Genom vorhanden sein sollen (Stumph et al., Nucleic Acids Res.9 (1981) 5383-5397). Ein Vergleich von verschiedenen Mitgliedern dieser Familie zeigt eine hochkonservierte Region an der Stelle 261 bis 391 (nach der Numerierung von Stumph et al. 1984). Das Primerpaar zur Bestimmung der Hühner-DNA wurde durch Alignment der repetitiven Sequenzen so ausgewählt, daß es spezifisch innerhalb dieser konservierten Sequenz bindet und ein 84 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, nämlich

15 CR1: ATGAGGCACTGGAACAGGTTGCC bp 260-283 Seq. ID 3.  
 CR1A CAGGGCCACATCCAGCCTGG bp 345-326 Seq. ID 4

(Numerierung nach Stumph et al. (1984)). Die Primer wurden unter Verwendung der Phosphoamidit-Chemie auf einem DNA-Synthesizer hergestellt (Applied Biosystems 394 DNA Synthesizer).

20 Die Standard-Plasmide pCR1+11 und pCR1-8 wurden durch Insertion synthetischer Oligonukleotide, welche die von CR1 stammende Sequenz von der Position 260 bis 345 (gemäß Stumph et al.) enthielten, zwischen die Ncol- und SacI-Stelle des pBluescript-Vektors erhalten. Für pCR1+11 enthält die CR1-Sequenz ein Insert von 11 Nukleotiden, und für das Standard-Plasmid pCR1-8 eine Deletion von 8 Nukleotiden an der Position 302 (gemäß Stumph et al.). Daher haben die von diesen Standard-Plasmiden stammenden PCR-Produkte eine Länge von 95 bzw. 76 bp. Das 25 Plasmid wurde gereinigt (QUIAGEN-Verfahren), die Konzentration durch spektroskopische Messung bei 260 nm bestimmt, mit EcoRI geschnitten und in einem 10mM TRIS/HCl pH 8/0,1 mM EDTA-Puffer verdünnt (Sambrook et al. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab Press, Cold Spring Harbor (1989)).

30 Die Erstellung der Eichgeraden erfolgt in analoger Weise zu 2.1. Im Experiment wurden 200, 40, 20, 10, 4 und 2 pg genommischer DNA aus Hühnerzellen (CEF-Zellen) extrahiert und einer PCR mit den fluoreszenz-markierten Primern CR1 und CR1A unterzogen. Als Spezifitätskontrolle wurden 100 pg Maus- und menschliche chromosomal DNA ebenfalls der PCR unterzogen. Als Negativkontrolle dienten 10 µl Wasser.

35 Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3 und Fig.3-A bis 3-D dargestellt.  
 Tabelle 3 gibt Art, Umfang und Meßwerte der gemessenen Proben wieder. In Spalte 1 ist die Nummer der Messung (entspricht einer Bahn-Nummer in Fig.3) angegeben; Spalte 2 gibt die Menge an eingesetzter genommischer DNA von CEF-Zellen an; Spalte 3 gibt die Fläche des gemessenen Peaks an.

TABELLE 3

1	CEF 200 pg/ml	61192
2	CEF 200 pg/ml	77128
3	CEF 40 pg/ml	36856
4	CEF 40 pg/ml	29229
5	CEF 20 pg/ml	22035
6	CEF 20 pg/ml	19008
7	CEF 10 pg/ml	13658
8	CEF 10 pg/ml	11333
9	CEF 4 pg/ml	2958
10	CEF 4 pg/ml	6533
11	CEF 2 pg/ml	3471
12	CEF 2 pg/ml	2907

TABELLE 3 (fortgesetzt)

13	H <sub>2</sub> O	0
14	H <sub>2</sub> O	0
16	Human DNA 100 pg/ml	0
17	Maus DNA 100 pg/ml	0

5 In Fig. 3 ist die graphische Auswertung der Bestimmung der PCR-Produkte dargestellt. In den verschiedenen Bahnen sind die Intensitäten der Fluoreszenzsignale der PCR-Produkte (und Nebenprodukte) dargestellt. Die Produkte sind anhand ihrer definierten Größe (in bp) identifizierbar. Der Wildtyp-Peak tritt bei 86 bp auf. Peakflächen sind in Tabelle 3 dargestellt.

10 In sämtlichen Bahnen, in denen Hühner-DNA eingesetzt wurde, erscheint ein definierter Peak bei 84 bp. Im Gegensatz dazu wird keine signifikante Menge an 84 bp-spezifischen Produkt detektiert, auch wenn große Mengen an 15 menschlicher bzw. Maus-DNA eingesetzt wurden. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man die Nachweisgrenze von chromosomaler Hühner-DNA im erfindungsgemäßen Verfahren auf kleiner als 2 pg/ml festlegen.

### 3.2. Quantifizierung von Hühner-DNA

20 Verdünnungen von Hühner-DNA von 25, 10, 5, 2,5 und 1 pg/ml und Wasser wurden extrahiert und der PCR untersogen. Tabelle 4 gibt die Anzahl der zugesetzten Standard-Plasmid-pCR+11 und Plasmid-pCR1-8 (Spalte 1 und 2), die Verdünnung (Spalte 3), das Volumen (Spalte 4), die Probenbeschreibung (Spalte 5), den Kommentar (Spalte 6), die Anzahl der CR1-Sequenzen in der Probe, berechnet mit dem -Standard (Spalte 7) oder mit dem +Standard (Spalte 8), den Mittelwert in pg von Hühner-DNA (Spalte 9), die Bahn, in welcher die Probe analysiert wurde (Spalte 10) und die Peak-Flächen von -Standard (Spalte 11), Wildtyp (Spalte 12) und +Standard (Spalte 13). Die graphische Auswertung der Bestimmung der PCR-Produkte ist in Fig. 3-E veranschaulicht. Die PCR-Produkte können durch ihre Größe identifiziert werden. Der Wildtyp-Peak erscheint bei 84 bp, der Minus-Standard-Peak bei 76 bp und der Plus-Standard bei 95 bp, die Peak-Flächen der Fluoreszenz-Signale sind in Tabelle 4 angegeben.

30

35

40

45

50

55

TABELLE 4

N- 2009	N- 2009	Von	Vol.	Probe	Erklärung	N- Basis	N- Dose	Ergebnis	GSH	Bahn	A-	AWI	A+
5000	15000	1	0.25	250g/m <sub>3</sub>	Hühner	32	113964	154065	26.0028	Hühner	32.13	2916	16616
5000	15000	1	0.25	100g/m <sub>3</sub>	Hühner	32	51850	54126	10.5770	Hühner	32.14	4132	10671
5000	15000	1	0.25	50g/m <sub>3</sub>	Hühner	32	22445	29066	5.1511	Hühner	32.15	3705	4158
5000	15000	1	0.25	2.50g/m <sub>3</sub>	Hühner	32	13426	15697	2.9123	Hühner	32.16	4342	2915
5000	15000	1	0.25	1.00g/m <sub>3</sub>	Hühner	32	65361	8486	1.5022	Hühner	32.17	4461	1458
5000	15000	1	0.25	0.50g/m <sub>3</sub>	Hühner	32	-1	-1	0	Hühner	32.18	3560	-1

## Patentsprüche

## 1. Verfahren zur Quantifizierung von genetischer DNA in einer Probe, welches die Schritte

- 5     - ) Amplifizieren der in der Probe enthaltenen DNA durch ein Nukleinsäure-Amplifizierungsverfahren unter Verwendung von Primern, welche zu repetitiven genetischen Sequenzen komplementär sind, und
- 10    - ) Detektieren der erhaltenen, amplifizierten DNA umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß
- 15    - ) vor dem Amplifizieren in an sich bekannter Weise eine gegebene Menge mindestens einer bekannten Nukleinsäure der Probe als interner Standard zugegeben wird, wobei sich die Standard-Nukleinsäure(n) zumindest in einem zu detektierenden Merkmal von der zu quantifizierenden genetischen DNA unterscheidet, und
- ) die Menge an amplifizierter genetischer DNA und die Menge an amplifizierter(n) Standard-Nukleinsäure(n) bestimmt werden und ausgehend von der (den) erhaltenen Menge(n) an Standard-Nukleinsäure(n) die Menge der ursprünglich in der Probe vorhandenen genetischen DNA bestimmt wird.

15    2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß beim Amplifizieren Primer mit fluoreszierenden oder radioaktiven Gruppen oder chemischen Gruppen, die mit affinen Proteinen und nachgeschalteten Detektionsreaktionen detektiert werden können, vorzugsweise mit fluoreszierenden Gruppen, verwendet werden.

20    3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß beim Amplifizieren Primer, welche an repetitive Sequenzen, vorzugsweise Alu-Sequenzen oder Alu-äquivalente Sequenzen binden, verwendet werden.

25    4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Amplifizierungsschritt bereits in der exponentiellen Phase gestoppt wird.

25    5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Bestimmung der Mengen an amplifizierter Nukleinsäure unter Verwendung eines Nukleinsäure-Detektionsgerätes, vorzugsweise eines fluoreszenz-empfindlichen Nukleinsäure-Detektionsgerätes, erfolgt.

30    6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß kontaminierende genetische DNA bestimmt wird.

35    7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß von der Menge an amplifizierter Standard-Nukleinsäure mittels einer Eichgerade die Menge der in der Probe zu quantifizierenden genetischen DNA bestimmt wird.

40    8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß beim Amplifizieren Primer, die zu einem Teil der Alu-äquivalenten Konsensussequenz, insbesondere der Alu-äquivalenten Konsensussequenz aus Wirbeltieren, wie Nagetieren oder Primaten, komplementär sind, verwendet werden.

40    9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die genetische DNA von CHO-, Vero-, BHK-, SK-Hep1-, Hybridom- oder CEC-Zellen quantifiziert wird.

45    10. Verwendung des Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Überprüfung und Qualitätskontrolle von biologischen Produkten, insbesondere von biotechnologisch erzeugten Produkten wie viralen Proteinen, insbesondere gp160, rekombinanten Blutfaktoren, Plasmaproteinen, Impfstoffen und monoklonalen Antikörpern.

50    11. Biologische, insbesondere biotechnologische Produkte, die zumindest einen Gehalt an chromosomaler DNA unterhalb der Grenze von 10 bzw. 100 pg pro Dosis, ermittelt nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, aufweisen und daher im wesentlichen frei von Fremd-DNA sind.

55    12. Biologische, insbesondere biotechnologische Produkte, nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß sie ausgewählt sind aus viralen Proteinen, insbesondere gp160, rekombinanten Blutfaktoren, Plasmaproteinen sowie Impfstoffen, insbesondere gegen Herpes-, Influenza-, Hepatitis- oder TBE- Viren, und monoklonalen Antikörpern.

   13. Primer mit der Sequenz gemäß der Seq.ID 1, 2, 3 und 4.

   14. Standard-Plasmide pAlu-wt, pAlu-20, pCR1-wt und pCR1+11, pCR1-8.

15. Set zur Quantifizierung genomicscher Nukleinsäuren in einer Probe, welches umfaßt:

- mindestens eine bekannte Nukleinsäure als internen Standard, welche sich von den zu quantifizierenden Nukleinsäuren in mindestens einem nachweisbaren Charakteristikum unterscheidet.
- Fluoreszenz-markierte Primer, die an die Standardnukleinsäure und an die zu quantifizierende Nukleinsäure binden.
- positive Kontrollen, welche bekannte Mengen an genomicscher Nukleinsäure aufweisen.
- eine negative Kontrolle, welche einen von Nukleinsäuren freien Puffer aufweist.
- eine Arbeitsanleitung.

10

16. Set zur Quantifizierung genomicscher DNA von Primaten in einer Probe, welches umfaßt:

- als internen Standard, das Plasmid pAlu 20
- die Fluoreszenz-markierten Primer Alu A2/2 und AluB
- positive Kontrollen, die bekannte Mengen an Vero-Zell-DNA aufweisen
- eine negative Kontrolle, die einen von genomicscher Nukleinsäure freien Puffer aufweist und
- eine Arbeitsanleitung.

17. Set zur Quantifizierung genomicscher Vogel-DNA in einer Probe, welches umfaßt:

20

- als internen Standard, die Plasmide pCR1+15 und pCR1-8
- die Fluoreszenz-markierten Primer CR1 und CR1A
- positive Kontrollen, die bekannte Mengen an Vogel-DNA aufweisen,
- eine negative Kontrolle, die einen von genomicscher Nukleinsäure freien Puffer aufweist und
- eine Arbeitsanleitung.

25

30

35

40

45

50

55

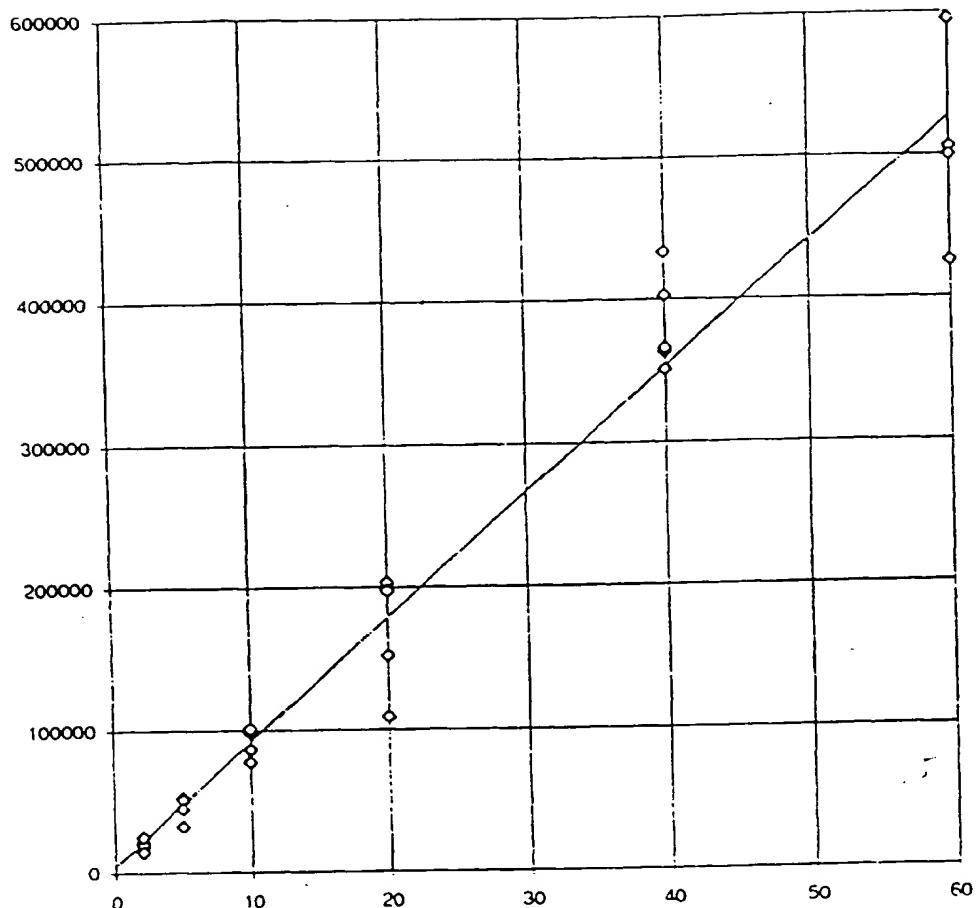


Fig. 1

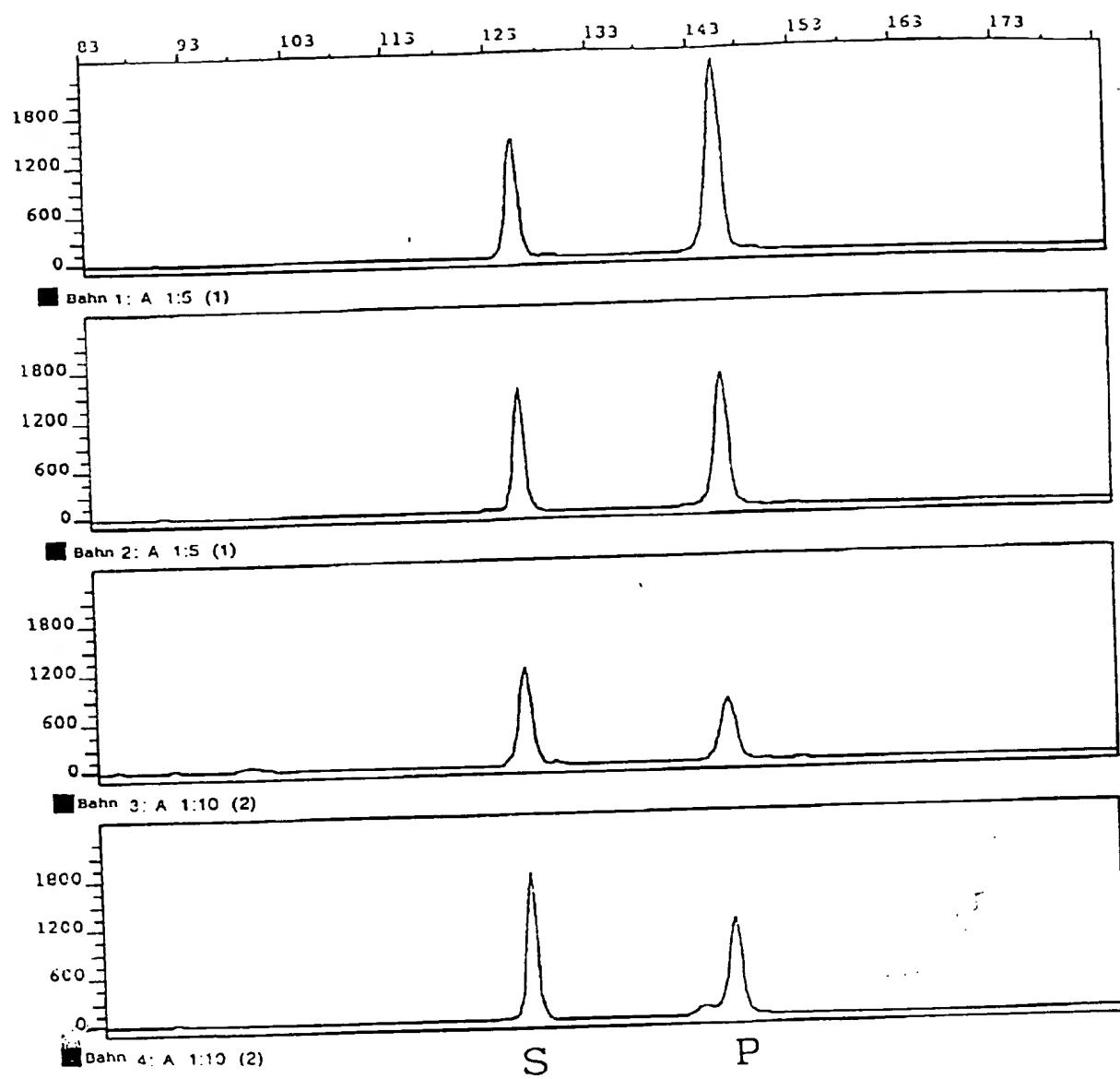


Fig. 2-A

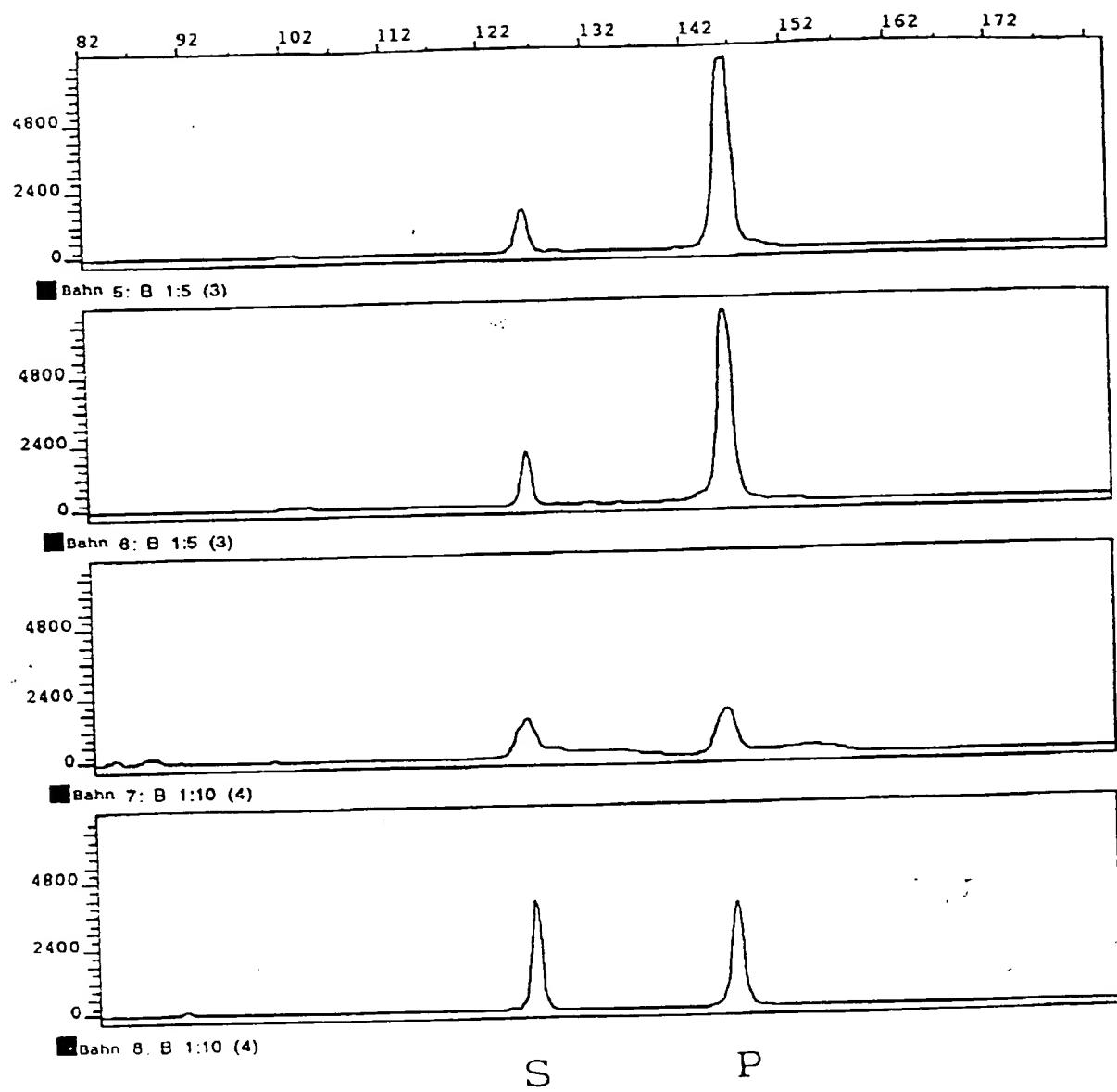


Fig. 2-B

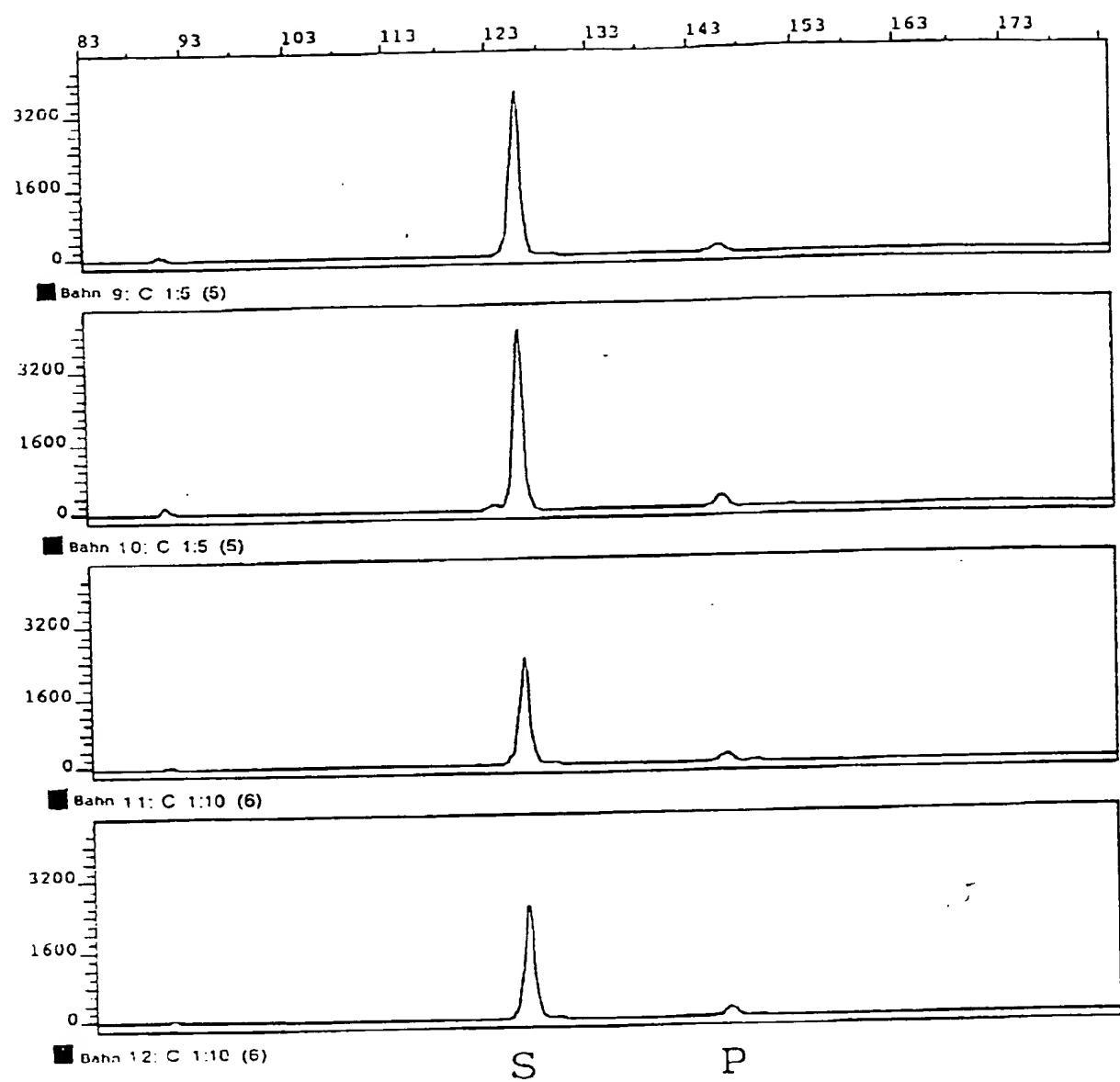


Fig. 2-C

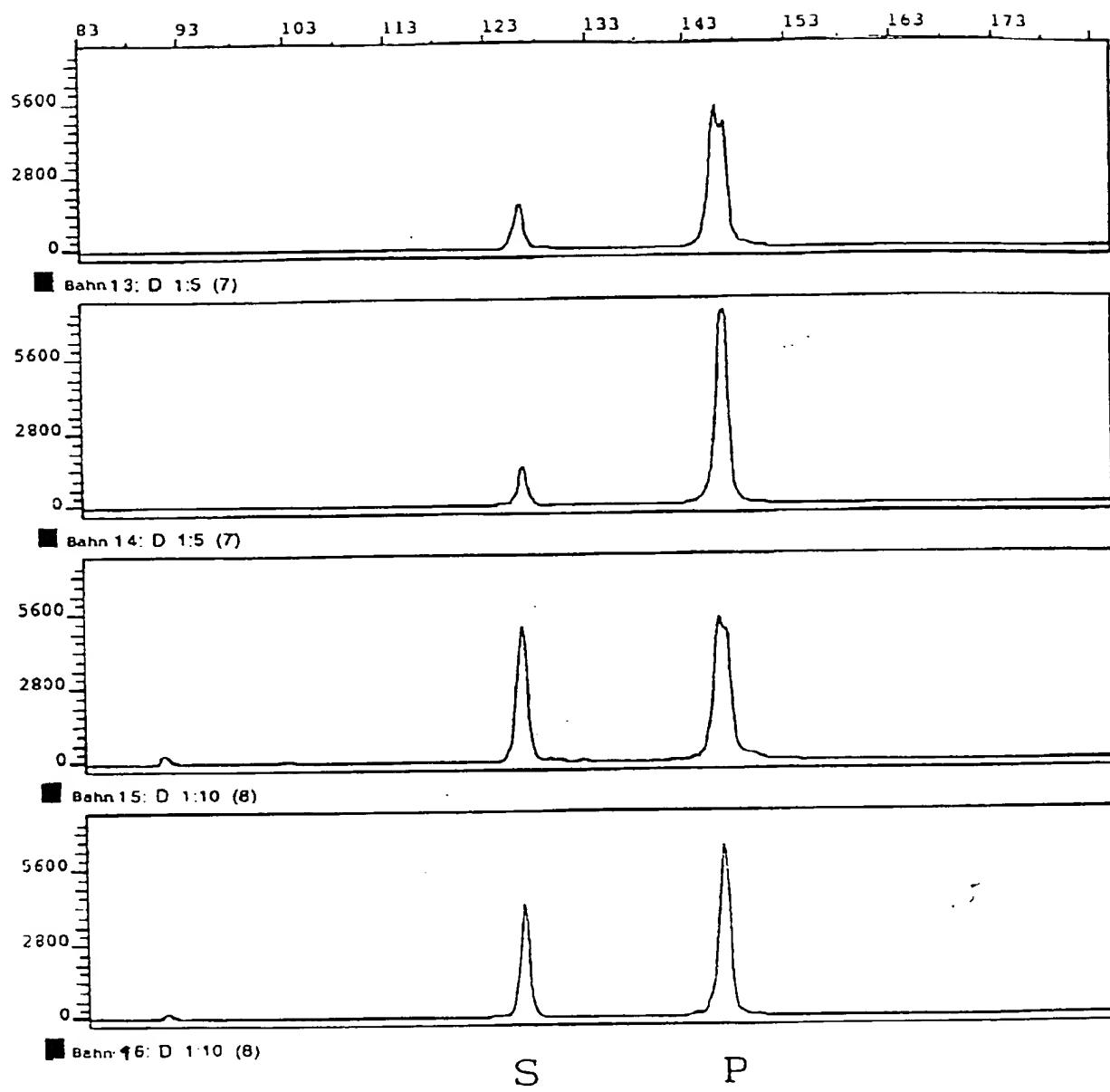


Fig. 2-D

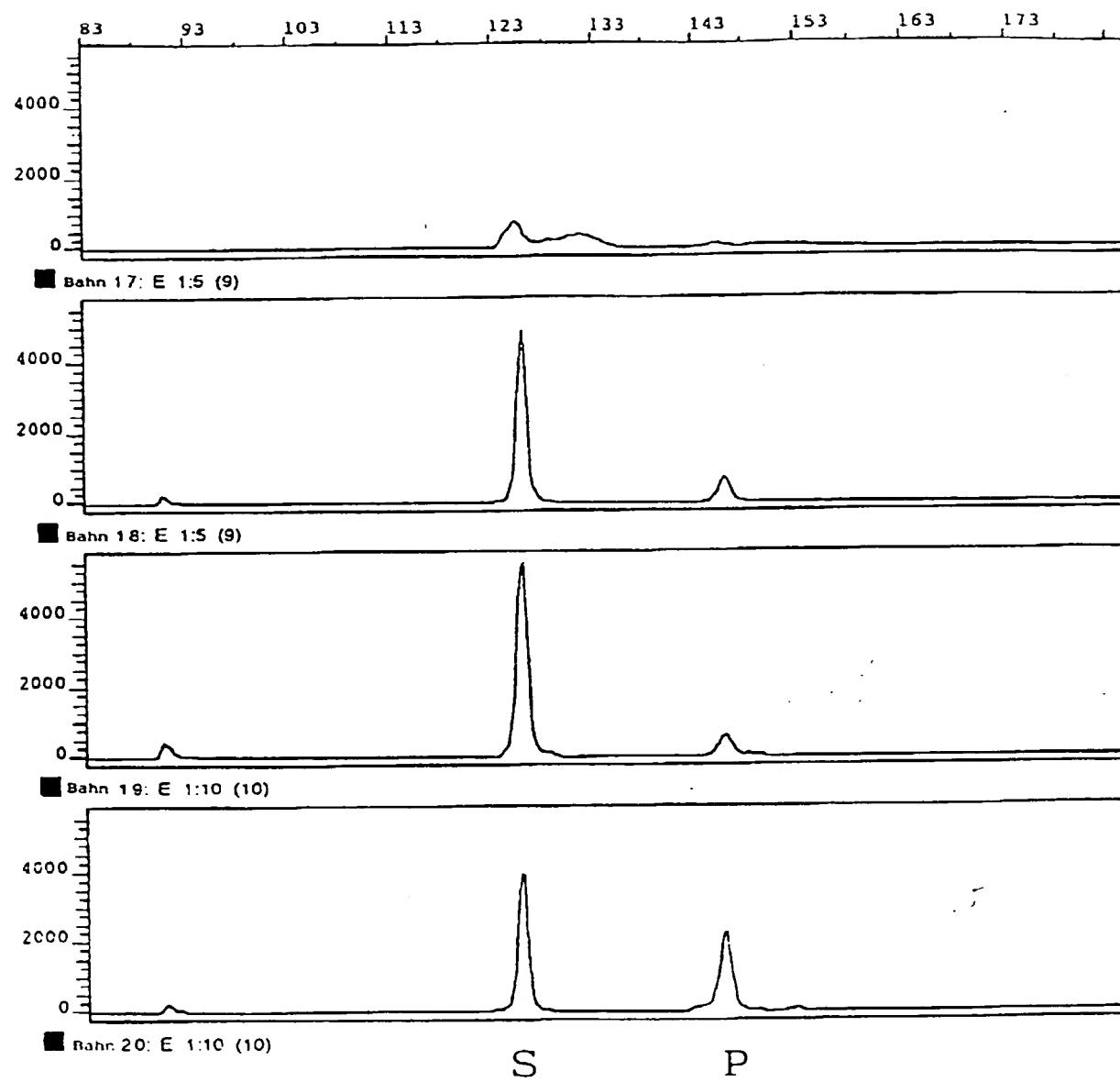


Fig. 2-E

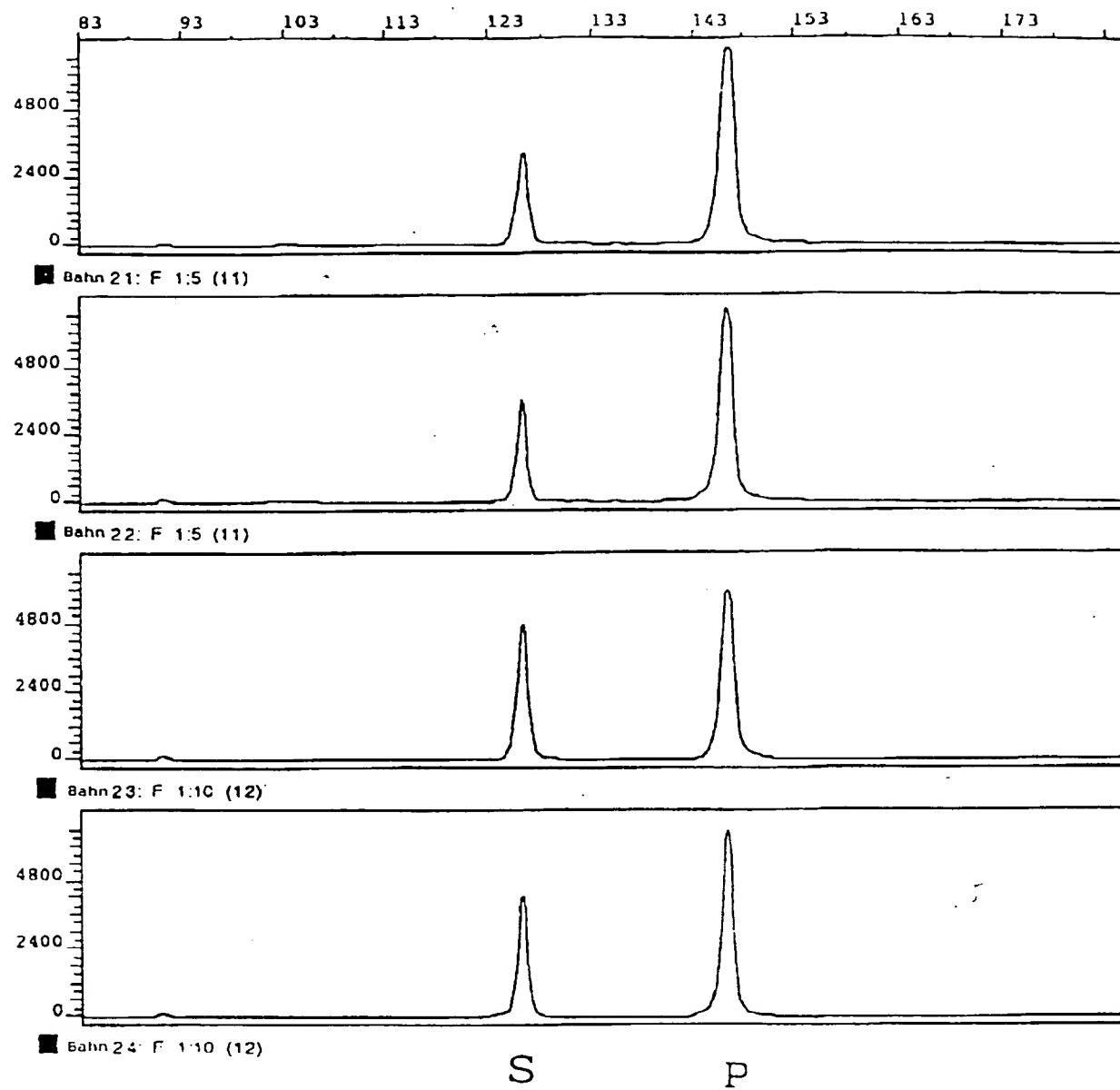


Fig. 2-F

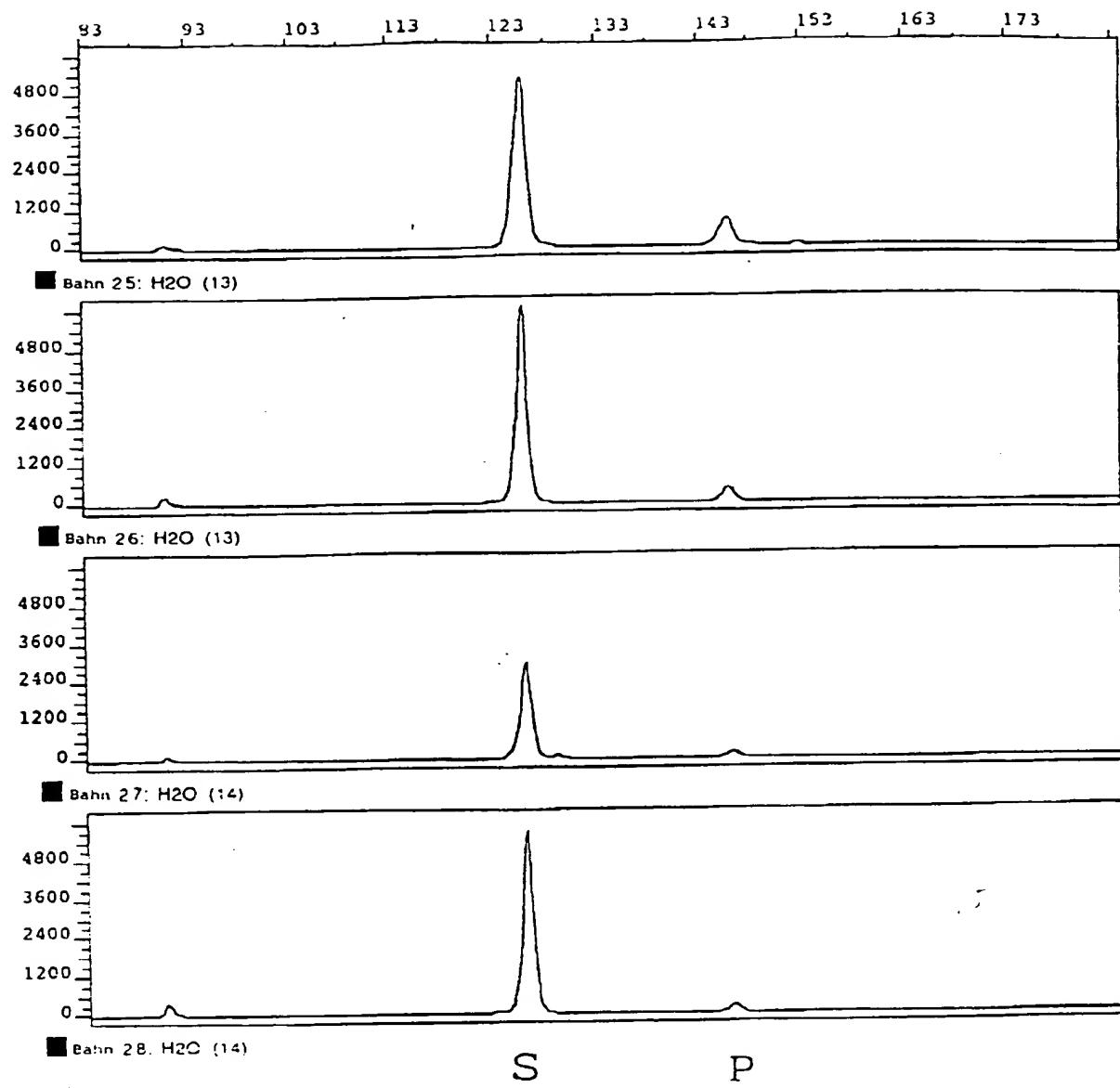


Fig. 2-G

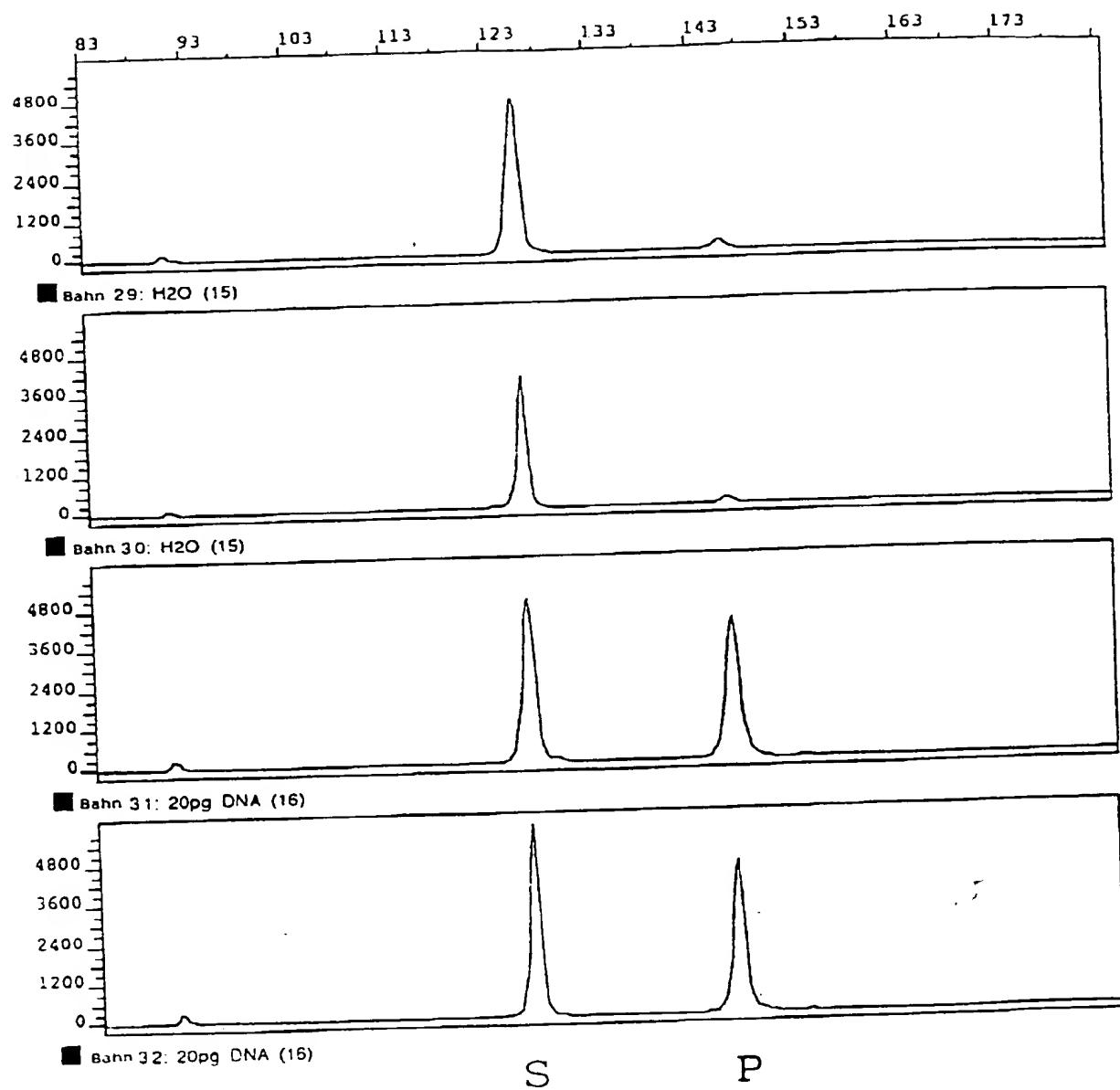


Fig. 2-H

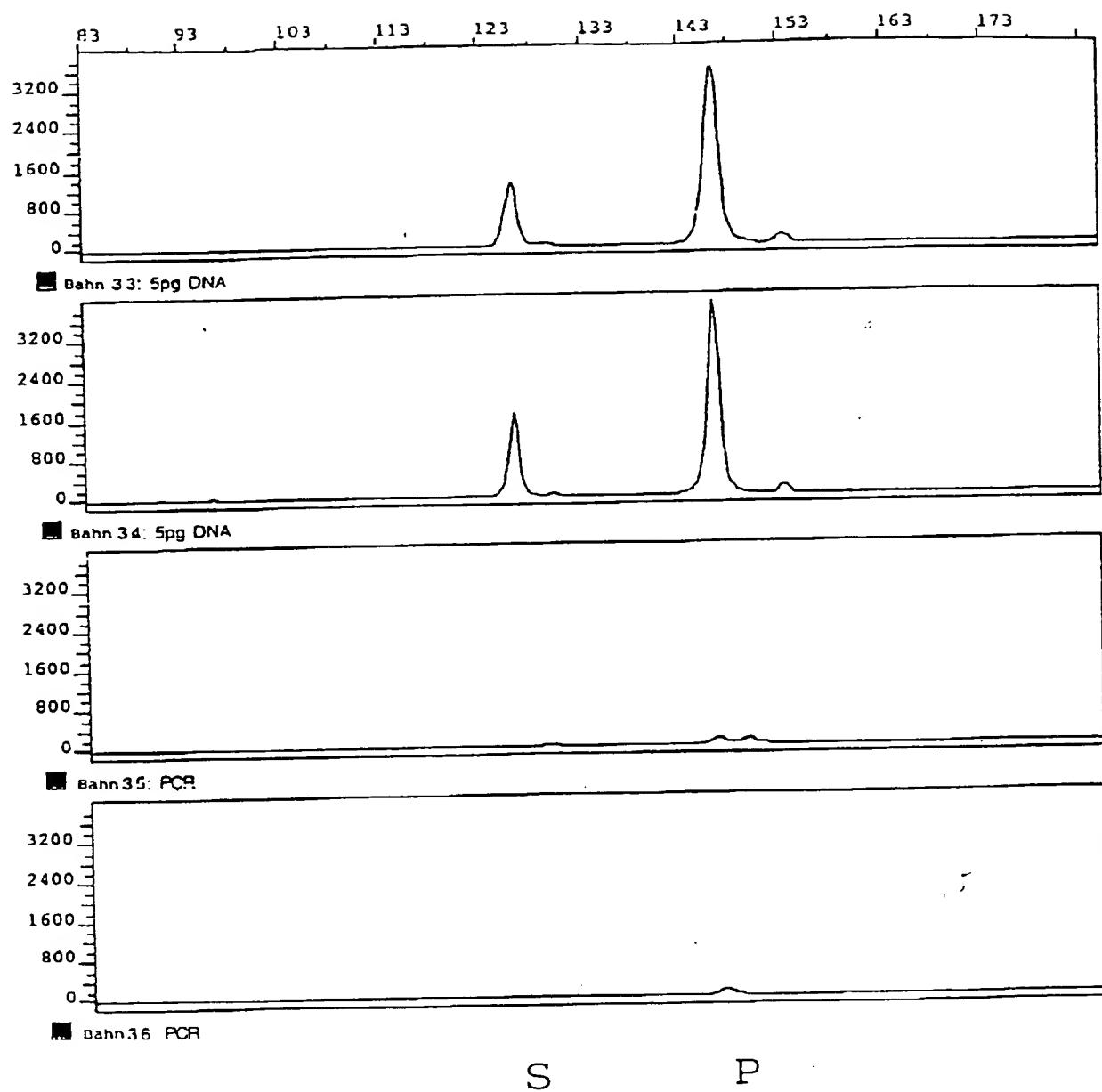


Fig. 2-I

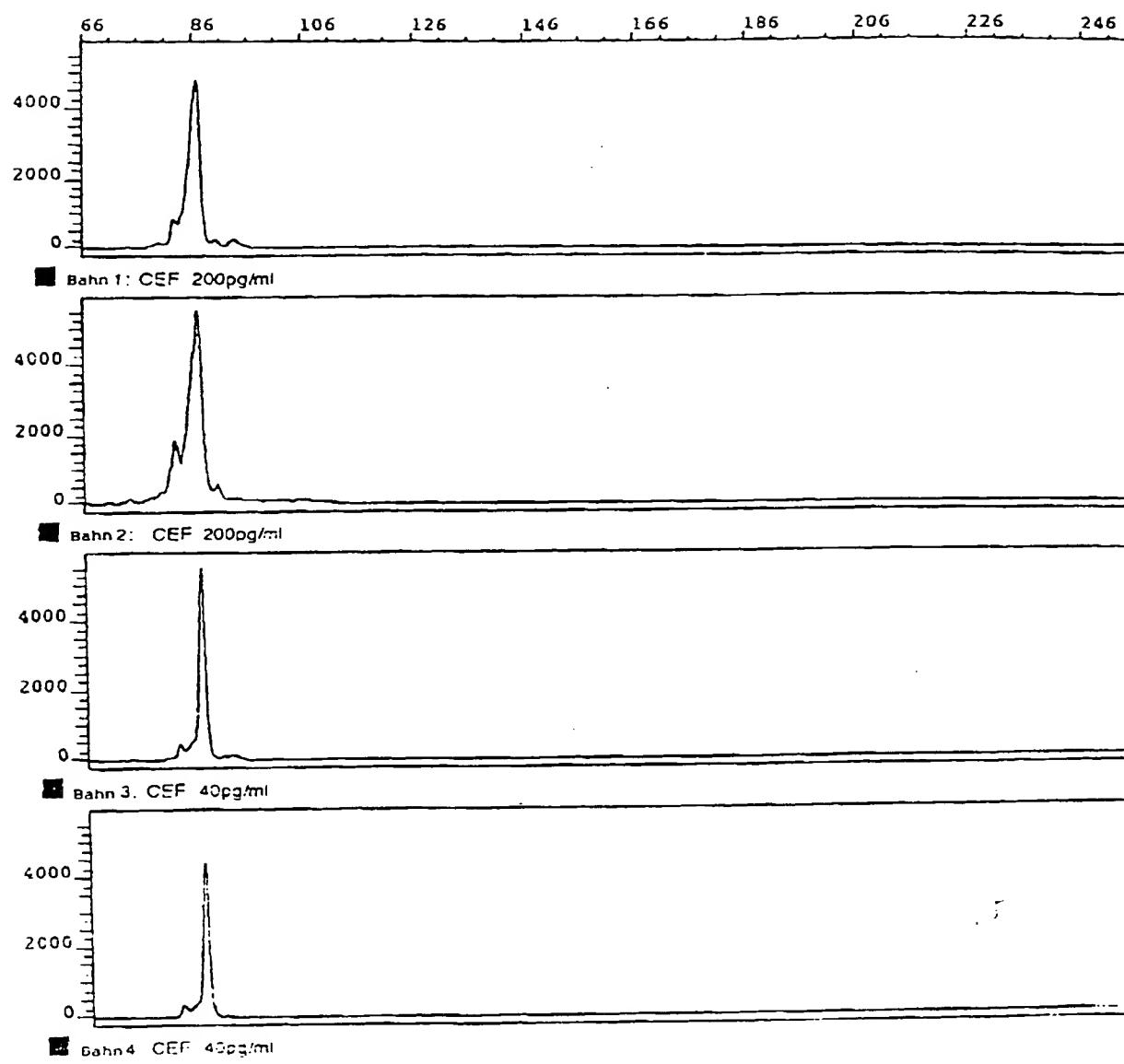


Fig. 3-A

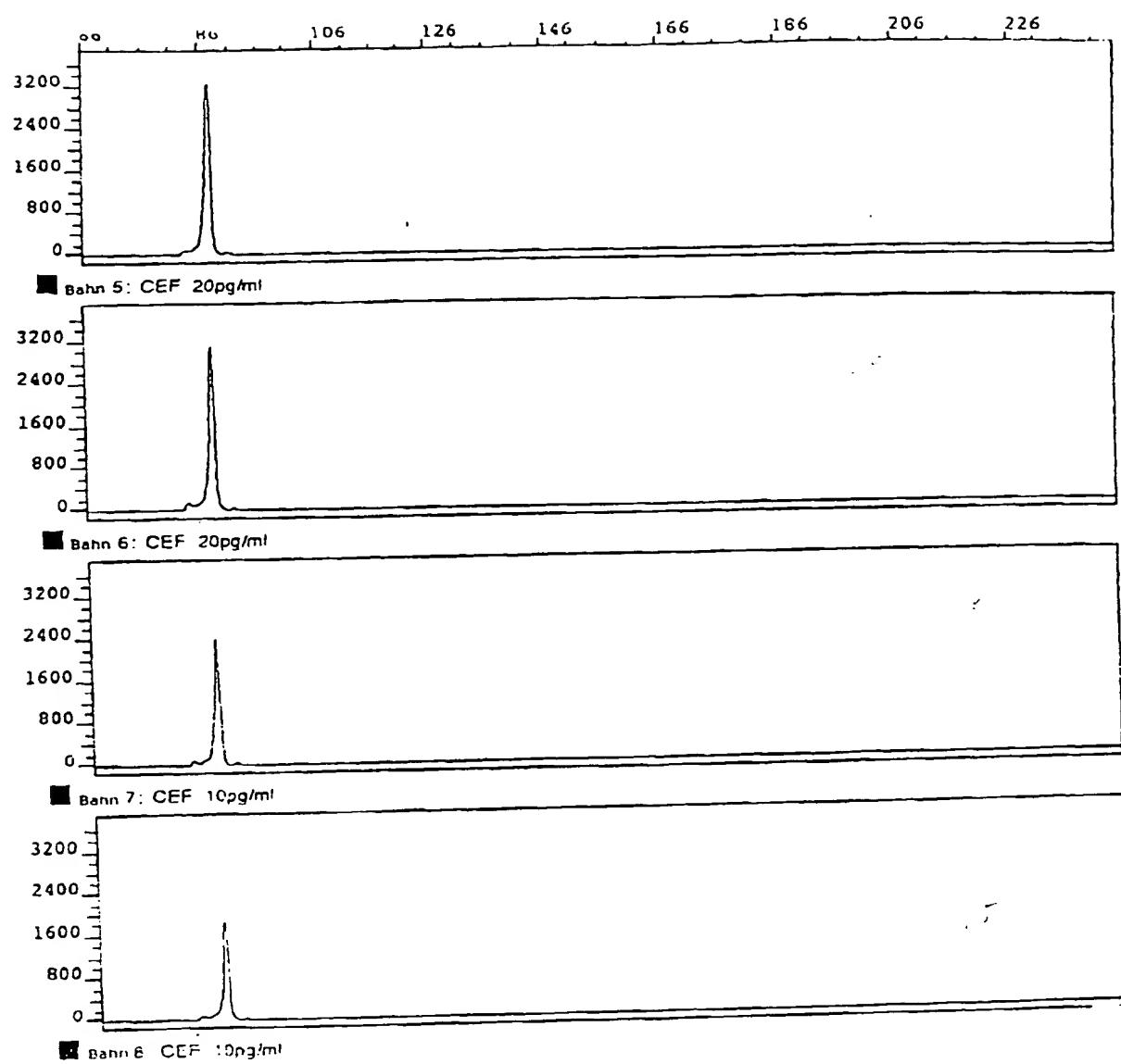


Fig. 3-B

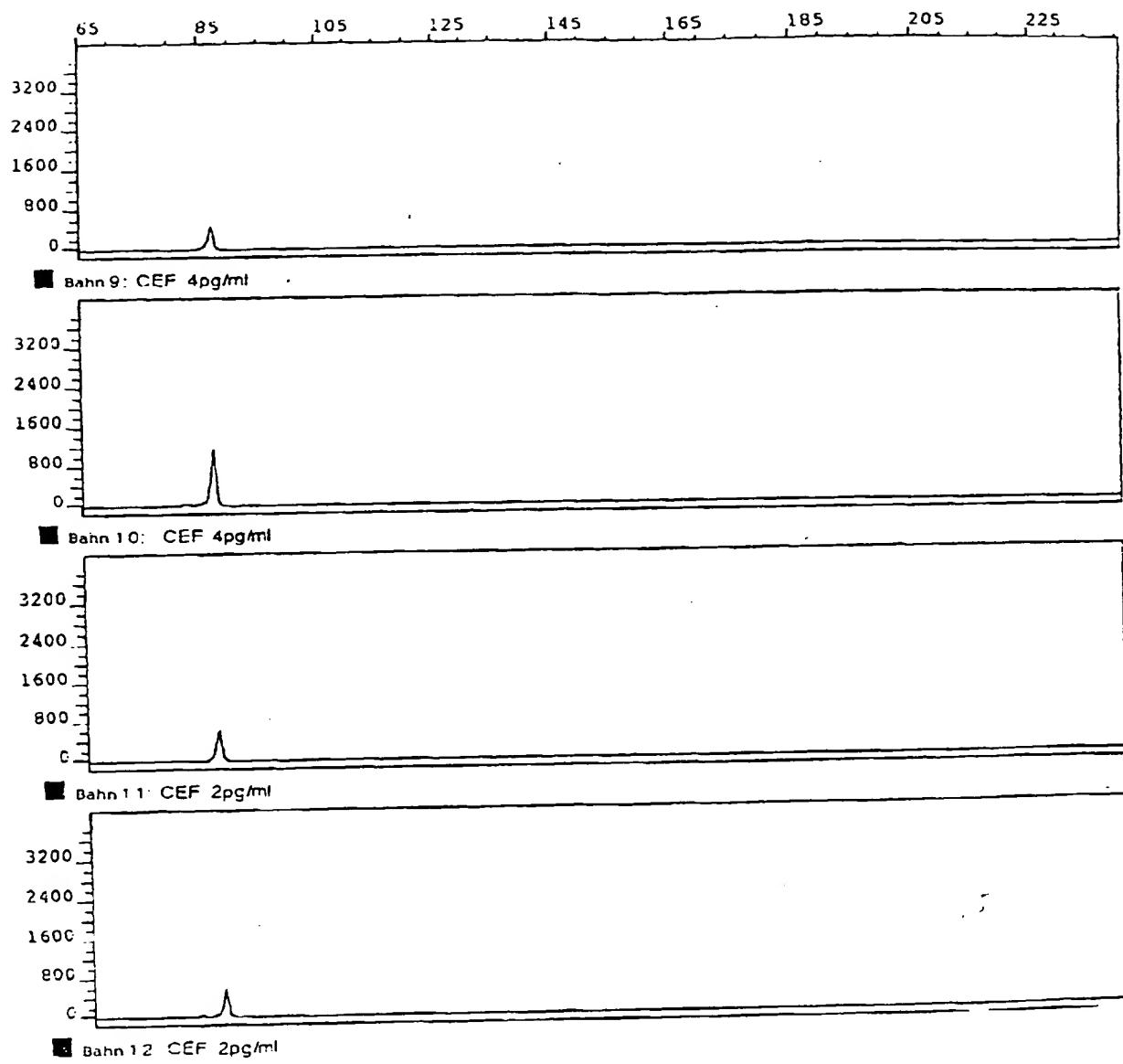


Fig.3-C

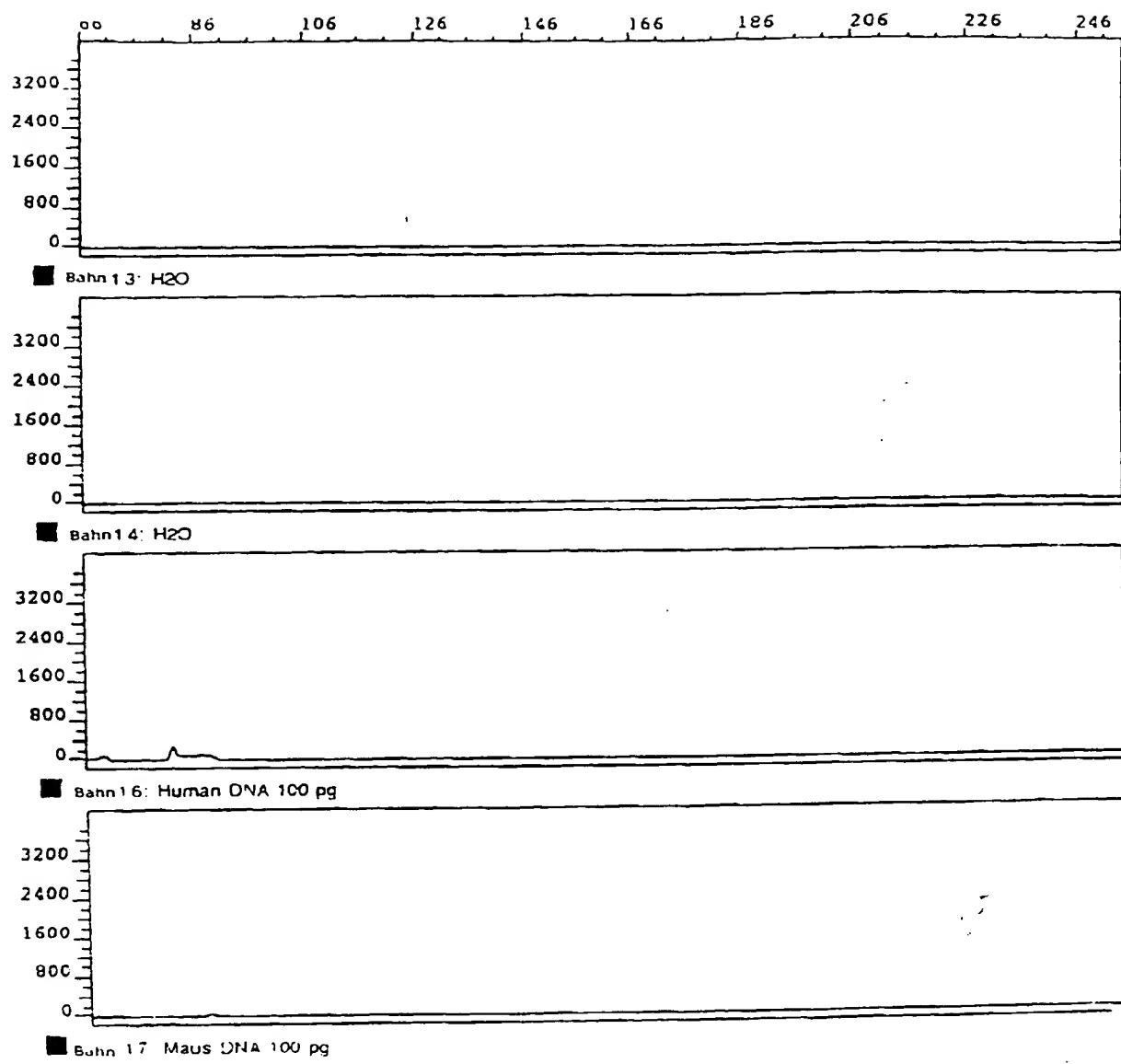


Fig. 3-D

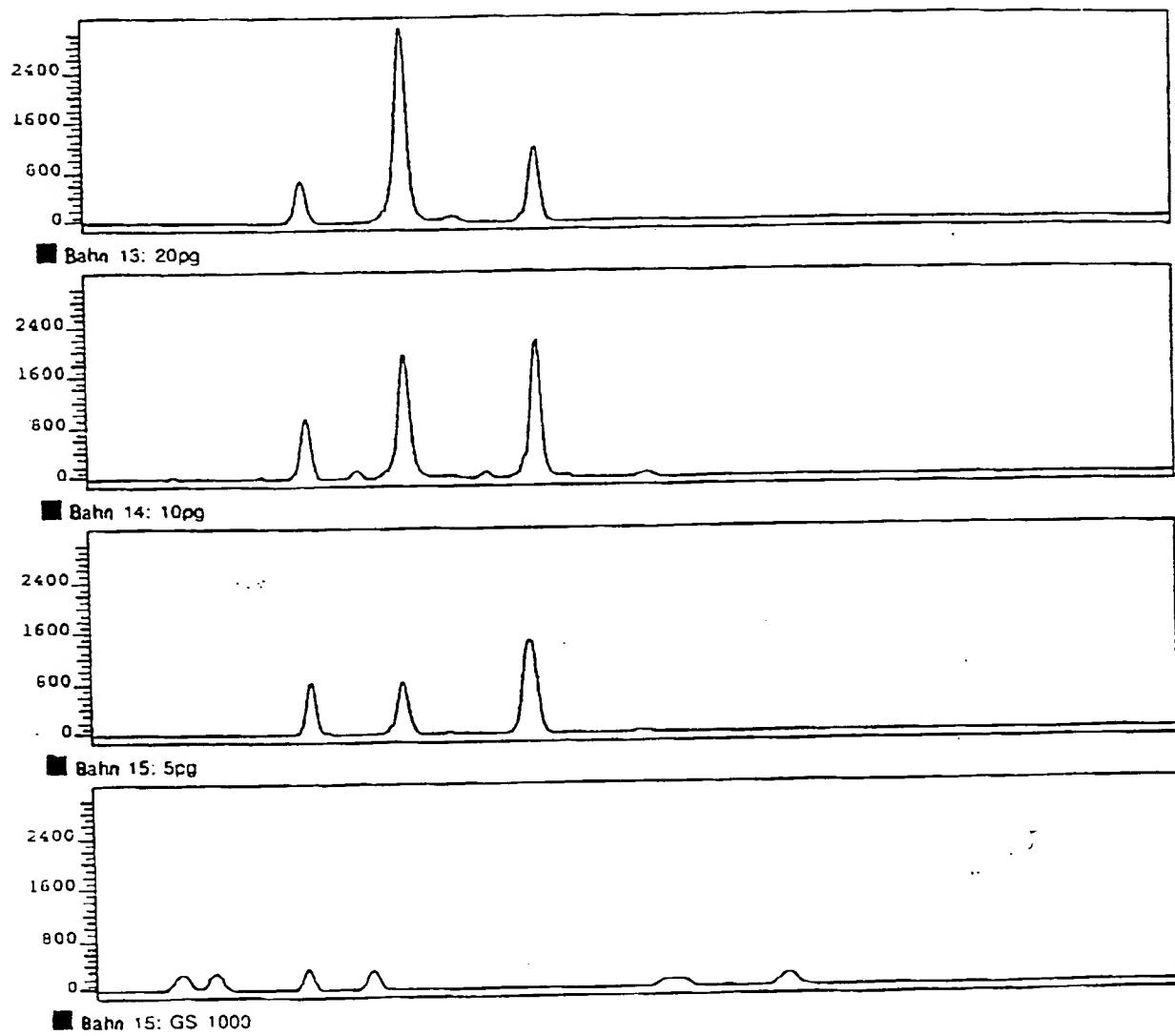


Fig.3-E

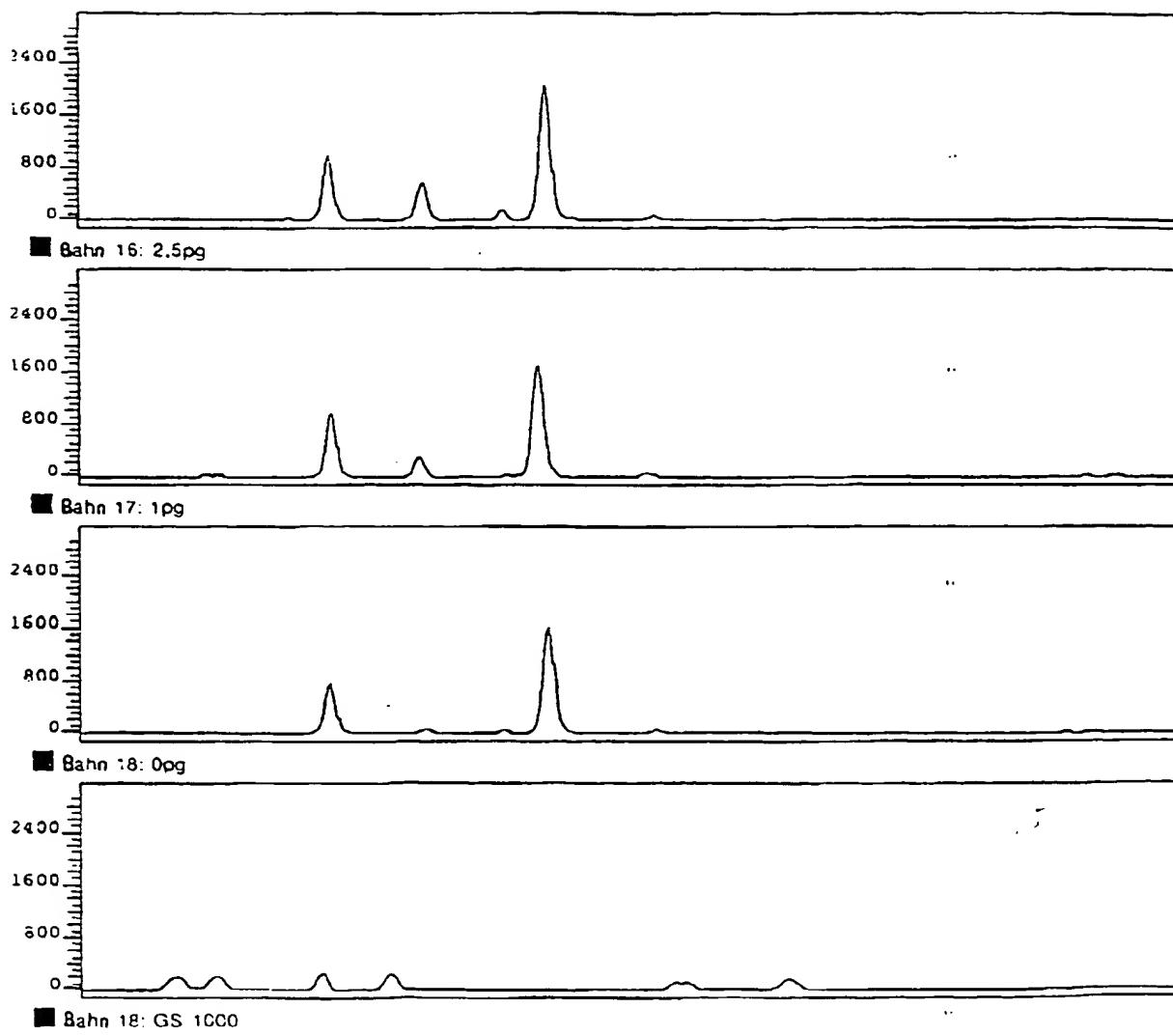


Fig. 3-F

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

## (i) ANMELDER:

- (A) NAME: Thomas Haemmerle
- (B) STRASSE: Hauptstrasse 46
- (C) ORT: Orth/Donau
- (D) BUNDESLAND: Austria
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 2304
  
- (A) NAME: Falko-Guenther Falkner
- (B) STRASSE: Neusiedlzeile 76A
- (C) ORT: Orth/Donau
- (D) BUNDESLAND: Austria
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 2304
  
- (A) NAME: Johann Kohl
- (B) STRASSE: Schuhmeierplatz 3/8
- (C) ORT: Wien
- (D) BUNDESLAND: Austria
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1160
  
- (A) NAME: Michele Himmelsbach
- (B) STRASSE: Laxenburgerstrasse 59/13
- (C) ORT: Wien
- (D) BUNDESLAND: Austria
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1100
  
- (A) NAME: Friedrich Dorner
- (B) STRASSE: Peterlinigasse 17
- (C) ORT: Wien
- (D) BUNDESLAND: Austria
- (E) LAND: Austria
- (F) POSTLEITZAHL: 1238

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Quantifizierung von  
genomischer DNA

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GCCGGCGCGTA CTGGCGCGCG CCTGTAGT

28

Fig. 4-A

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GAGACAGAGT CTCGCTCTGT CGCCCAGG

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

ATGAGGCACT GGAACAGGTT GCCC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 20 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotid  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CAGGGCCACA TCCAGCCTGG

20

Fig. 4-B